

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
AUDRÉE DE MONTIGNY

MISE EN ÉVIDENCE D'UNE VOIE DE SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS
NMDA SUSCEPTIBLE DE LIMITER LA PHOSPHORYLATION DE LA
PROTÉINE TAU

AOÛT 2014

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

L'éducation est votre arme la plus puissante pour changer le monde
—Nelson Mandela

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à témoigner ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce projet de maîtrise en neurobiologie. En particulier, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Guy Massicotte, pour son support, sa disponibilité, sa patience et surtout ses judicieux conseils qui m'ont guidée tout au long de ma maîtrise. Merci de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire et de m'avoir permis de connaître la recherche. Merci pour ton support financier, par l'intermédiaire d'une subvention du CRSNG, qui m'a permis de me consacrer entièrement à mes études.

Je voudrais aussi remercier le professeur Michel Cyr pour sa collaboration tant dans les expériences par l'utilisation de plusieurs appareils financés par son laboratoire, que pour sa participation dans la publication de l'article scientifique présenté et tout simplement, pour son aide et son soutien durant ma maîtrise.

Je remercie Julie Allyson, pour son aide technique, pour sa patience lors de mon apprentissage et pour ses sages recommandations à mes débuts. Je remercie mon amie et collègue, Marie-Elaine Laurier-Laurin, qui me supporte dans mes questionnements et la réalisation de mes expériences tous les jours et surtout de m'avoir accompagnée lors du congrès. Merci à Ismaël Elhiri qui a contribué à la réalisation d'expériences pour l'article scientifique de ma maîtrise. Je voudrais aussi remercier tous les collègues des différents laboratoires que j'ai côtoyés durant ces années et qui m'ont donné leur support lorsque j'en avais besoin, particulièrement Geneviève Bureau qui a toujours répondu avec le sourire à mes innombrables questions.

Je remercie ma famille, Martine, Pierre, Jacinthe et Étienne, pour leur présence et leur soutien tout au long de mon cheminement académique. Merci à mes parents pour les valeurs que vous m'avez transmises, le respect, la persévérance et la patience qui m'ont permis d'accomplir toutes mes études. Merci à mon amoureux, Marc-André, de m'avoir

encouragée et aidée, particulièrement pour l'anglais, mais surtout d'être là, avec et pour moi dans les moments heureux comme les plus difficiles.

Finalement, je tiens à remercier madame Catarina Leote Franco Pio qui a répondu à mes nombreuses questions dans la préparation de mon mémoire.

RÉSUMÉ

Connu depuis plus de trente ans, les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) du neurotransmetteur glutamate s'avèrent un système essentiel pour le fonctionnement des neurones. Sur le plan physiologique, ces récepteurs jouent un rôle primordial pour la mise en œuvre des mécanismes de la plasticité neuronale dans l'hippocampe, une région essentielle au stockage des souvenirs. Ironiquement, ces récepteurs se sont vus attribuer, au fil du temps, une réputation peu enviable de par leur capacité à accroître la mort des neurones lors de multiples conditions neuropathologiques. Les scientifiques sont encore loin de pouvoir modéliser toutes les étapes moléculaires assurant les effets physiologiques et pathologiques des récepteurs NMDA dans le cerveau. Toutefois, nous savons depuis quelques années que ces récepteurs sont le fruit d'une organisation complexe de protéines membranaires qui peuvent, selon leur agencement, encourager ou encore limiter les processus de la dégénérescence neuronale. Dans cette foulée, les résultats obtenus dans le cadre du présent mémoire de maîtrise tendent à démontrer que l'activité préférentielle des récepteurs synaptiques composés par les sous-unités protéiniques NR1/NR2A induit une baisse de la phosphorylation de la protéine Tau dans l'hippocampe de rats. Sur le plan biochimique, nous avons mis en évidence que l'activité des récepteurs NR1/NR2A entraîne une diminution de la phosphorylation des sites Ser199-202 de la protéine Tau, alors que l'état de phosphorylation des sites Ser262 et Ser404 de la protéine s'avère inchangé. Nos données montrent, par ailleurs, que la perte de la phosphorylation de Tau induite par l'activation des récepteurs NR1/NR2A découle de la mise en œuvre d'une cascade biochimique impliquant l'ion calcium, l'activation subséquente de la protéine kinase C (PKC) et finalement l'inactivation de l'enzyme GSK3 β . Ces observations font évidemment naître une perspective de recherche attrayante pour le traitement de plusieurs maladies neurodégénératives se caractérisant par des états d'hyperphosphorylation de Tau, dont la maladie d'Alzheimer. De fait, ces résultats nous laissent croire que le développement de molécules susceptibles d'activer les récepteurs NR1/NR2A pourrait s'avérer une approche nouvelle permettant de limiter l'état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau, une hypothèse originale qui s'oppose évidemment à l'idée générale voulant que le traitement de la maladie d'Alzheimer repose essentiellement sur le blocage des récepteurs NMDA.

Mots-clés : récepteurs NMDA, protéine Tau, maladies neurodégénératives, neuroprotection, GSK-3 β , hippocampe

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Généralités	1
1.2 Les récepteurs NMDA du neurotransmetteur glutamate	3
1.2.1 Aspects physiologiques et pathologiques	3
1.2.2 L'hétérogénéité des récepteurs NMDA : Une clé pour comprendre les maladies neurodégénératives	5
1.3 La protéine Tau : isoformes et phosphorylation	9
1.3.1 Les enchevêtrements neurofibrillaires et la protéine Tau	11
1.3.2 La régulation de la phosphorylation de la protéine Tau	14
1.4 Relation entre les récepteurs NMDA et la protéine Tau.....	16
CHAPITRE II	
HYPOTHÈSE DE RECHERCHE.....	18
2.1 Originalité de la recherche proposée	21
CHAPITRE III	
MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE.....	22
3.1 Les antagonistes des récepteurs NMDA.....	22
3.2 Les tranches d'hippocampe de rats.....	23
CHAPITRE IV	
NMDA REDUCES TAU PHOSPHORYLATION IN RAT HIPPOCAMPAL SLICES BY TARGETING NR2A RECEPTORS, GSK3β AND PKC ACTIVITIES	25
4.1 Contribution des auteurs.....	25
4.2 Article scientifique.....	26
Summary.....	27

Introduction.....	28
Materials and Methods	30
Ethics approval	30
Animals and pharmacological agents	30
Antibodies.....	30
Hippocampal slices and tissue samples	31
Western blotting.....	31
Statistical analysis.....	32
Results	33
Tau Phosphorylation at Ser199-202 is Reduced by NMDA Treatment: Role of NR2A-Containing Receptors	33
NMDA-Induced Regulation of Tau Phosphorylation: Role of Calcium and GSK3 β	34
NMDA-Induced Tau Regulation Relies on PKC Activation.....	35
Discussion.....	36
Summary and Conclusions.	39
Acknowledgments	40
Figure Legends	41
Références.....	53
CHAPITRE V	
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	59
5.1 La protéine Tau : effets sur sa phosphorylation et sa localisation.....	59
5.2 La signalisation induite par l'activation des récepteurs NMDA	63
5.3 Conclusion et perspectives thérapeutiques	67
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	70

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	La dichotomie des récepteurs NMDA.	8
1.2	La protéine Tau et ses isoformes.	10
1.3	La dégénérescence neurofibrillaire.	12
1.4	La régulation de la protéine kinase GSK3 β	16
2.1	Schéma des hypothèses.	21
3.1	Les antagonistes des récepteurs NMDA.	23
3.2	Caractéristiques morphologiques des tranches d'hippocampe.	24

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPA	α -alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AVC	Accident vasculaire cérébral
CAMKII	Kinase dépendante du calcium et de la calmoduline
CDK5	Kinase cycline-dépendante 5
CREB	Protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMPc
ERK	Kinase régulée par un signal extracellulaire
FTDP-17	Démence frontotemporale avec syndrome parkinsonien lié au chromosome 17
GSK3	Glycogène synthase kinase-3
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
NVP	NVP-AAM077 ou [(R)-[(S)-1-(4-bromo-phenyl)-ethylamino](2,3-dioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydro-quinoxalin-5-yl)-methyl] phosphonic acid
MAP	Protéine associée aux microtubules
MARK	Kinase régulatrice des microtubules
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PDPK	Protéine kinase dirigée vers les prolines
PHF	Filaments appariés en hélice

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PP	Phosphatase
RO	RO25-6981 ou (aR,~S)-a-(4-Hydroxyphenyl)-~-methyl-4-(phenylmethyl)-l-piperidinepropanol maleate
Ser	Sérine
Tyr	Tyrosine

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Généralités

Il est maintenant bien connu que la communication entre les neurones constitue un mécanisme essentiel au bon fonctionnement du système nerveux et au stockage des souvenirs. Cette communication s'effectue au sein de connexions complexes appelées synapses. Ces dernières seraient impliquées dans la mise en œuvre des processus d'apprentissage et de mémoire. De fait, les souvenirs trouveraient leurs origines dans la capacité de ces connexions à modifier de manière durable leurs réponses aux agents chimiques environnants, notamment les neurotransmetteurs. Le glutamate est l'une de ces substances et nombreuses sont les études qui tendent à démontrer que le stockage des souvenirs dans le système nerveux central des mammifères correspond à des changements de la force synaptique impliquant des modifications soit au niveau des récepteurs pour le neurotransmetteur glutamate ou encore par la probabilité de relâche de neurotransmetteur (Michaelis, 1998; Traynelis *et al.*, 2010).

L'hippocampe est une région du cerveau particulièrement importante pour l'apprentissage et la mémoire. Cette région est d'ailleurs atteinte d'emblée dans plusieurs maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. De nombreuses recherches ont étudié les récepteurs au glutamate dans l'hippocampe puisqu'il est possible d'observer les changements de force synaptique. D'ailleurs, l'hippocampe est la région d'intérêt pour les expériences faites dans ce mémoire.

Les études pharmacologiques et moléculaires ont permis d'identifier une panoplie de récepteurs pour le neurotransmetteur glutamate. La littérature distingue, essentiellement, deux grands groupes de récepteurs glutamatergiques nommés ionotropes et métabotropes. Les récepteurs ionotropes comprennent trois

différentes familles pharmacologiques appelées : i) α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), ii) N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et iii) kaïnate (Waxman et Lynch, 2005; Traynelis *et al.*, 2010). Ces récepteurs agissent principalement en favorisant le passage rapide de l'influx nerveux au niveau de la synapse et contrôlent, du coup, les concentrations neuronales en ions, dont le calcium. D'ailleurs, le calcium intracellulaire accumulé à la suite de l'activation des récepteurs au glutamate semble particulièrement important dans les processus neuronaux assurant le développement et la croissance du cerveau, mais aussi, dans les processus d'apprentissage et de mémoire relatifs à des tâches cognitives complexes, comme la reconnaissance de l'environnement spatial (Yu *et al.*, 2009). En effet, de nombreuses études montrent que la modulation dans la synapse des récepteurs au glutamate, particulièrement les récepteurs AMPA et NMDA, permet la formation des souvenirs (Michaelis, 1998; Riedel *et al.*, 2003).

Curieusement, les données expérimentales ont également convergé à identifier le neurotransmetteur glutamate comme une substance potentiellement toxique pour le cerveau. La mauvaise réputation du glutamate en tant qu'agent délétère est justifiée par de nombreuses études démontrant que la suractivation des récepteurs au glutamate engage une cascade biochimique nocive conduisant à la mort des neurones. Le terme d'excitotoxicité est de fait utilisé pour désigner l'action néfaste du glutamate et de ces congénères, causant de la neurodégénérescence. Sur le plan pharmacologique, les récepteurs NMDA du glutamate furent initialement placés sur le banc des accusés comme agent déclencheur de l'excitotoxicité (Waxman et Lynch, 2005; Lau et Tymianski, 2010). Les neurobiologistes ont toutefois constaté que ces récepteurs peuvent, dans certaines circonstances, contrer la mort des neurones. Un paradoxe qui continue aujourd'hui d'alimenter les conversations scientifiques. De ce point de vue, les études récentes de décomposition moléculaire laissent à penser que l'expression de certaines sous-unités protéiques formant les récepteurs NMDA (c.-à-d. les protéines NR2A) pourrait s'avérer un système de réception membranaire indispensable susceptible de contrer le processus d'excitotoxicité.

Dans ce sens, une étude publiée par notre laboratoire a permis de démontrer que la perte d'activité des récepteurs NR2A contribue à augmenter l'état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Allyson *et al.*, 2010). Les protéines Tau sont nombreuses et plusieurs maladies neurodégénératives comme la démence fronto-temporale liée au chromosome 17 (FTDP-17), la paralysie progressive supranucléaire et la maladie d'Alzheimer se caractérisent par un état d'hyperphosphorylation de Tau (Morris *et al.*, 2011). Il y a sans contredit un lien entre l'hyperphosphorylation de Tau et la fonction des récepteurs NR2A qui nécessite des recherches plus approfondies.

1.2 Les récepteurs NMDA du neurotransmetteur glutamate

1.2.1 Aspects physiologiques et pathologiques

La recherche sur l'implication des récepteurs NMDA dans les processus d'apprentissage et de mémorisation a connu de brillants développements sur le terrain des sciences cognitives. Les résultats comportementaux montrent l'implication des récepteurs NMDA dans la mémorisation de tâches diverses concernant, d'une part, la région hippocampale du cerveau et, d'autre part, la mise en œuvre de la plasticité neuronale dans cette même région. De fait, la mémoire est généralement considérée comme découlant de modifications durables de la force neuronale au niveau des connexions synaptiques glutamatergiques. La force synaptique implique des modifications au niveau du nombre de récepteurs à la membrane ou encore par la quantité de glutamate relâché dans la synapse. Afin d'évaluer les changements neuronaux, il est possible d'observer la potentialisation à long terme (LTP). La LTP hippocampique est un marqueur très sensible de la fonction synaptique reconnue pour participer aux stockages des souvenirs (Yashiro et Philpot, 2008; Sanz-Clemente *et al.*, 2013). Ce marqueur a d'ailleurs permis de montrer l'importance des récepteurs NMDA dans l'apprentissage et la mémoire.

À ce propos, nombreuses sont les expériences impliquant les récepteurs NMDA dans le développement de cette forme de plasticité neuronale. Par ailleurs, les résultats

d'études sur des animaux, ayant une diminution des récepteurs NMDA de l'hippocampe, démontrent des déficits importants en LTP ce qui constitue une étape incontournable au déclin cognitif (Nihei *et al.*, 2000; Guilarte et McGlothan, 2003). Il est à noter que la délétion génétique des récepteurs NMDA est létale. Les modèles d'études ont alors soit une délétion dans certaines régions seulement ou simplement une altération du nombre ou de la fonction des récepteurs. Sur le terrain de la physiologie, les récepteurs NMDA ne sont pas seulement engagés dans le processus de LTP, mais ils remplissent également des rôles importants dans le développement du cerveau. Un certain nombre d'observations laissent à penser que la mise en œuvre des connexions cérébrales au cours du développement du cerveau requiert une activité intrinsèque des récepteurs glutamatergiques de type NMDA. Par exemple, les chercheurs ont démontré que le blocage de ces récepteurs affecte grandement le développement des neurones de plusieurs régions du cerveau (Ikonomidou *et al.*, 1999; Monti et Contestabile, 2000), notamment ceux situés dans le gyrus denté (Gould *et al.*, 1994); une sous-région de l'hippocampe.

Outre ses effets bénéfiques, il est aussi attribué aux récepteurs NMDA des effets potentiellement toxiques dans certaines conditions pathologiques. En effet, ces récepteurs sont connus pour leur implication dans la mise en œuvre du phénomène d'excitotoxicité, processus sous-jacent de la mort neuronale. L'excitotoxicité est relativement bien documentée et participerait à la mort neuronale induite lors de traumatismes divers comme ceux associés aux accidents vasculaires cérébraux (AVC) et à l'épilepsie (Morimoto, 1989; Isokawa et Levesque, 1991; Meldrum, 1995). Il faut savoir que lors d'une attaque cérébrale, les cellules du cerveau sont privées d'oxygène durant une période plus ou moins longue. Ce manque d'énergie entraîne un déséquilibre ionique qui mène à une grande libération ponctuelle de glutamate et, conséquemment, à l'activation excessive des récepteurs NMDA qui favorise l'excitotoxicité (Dirnagl *et al.*, 1999; Lo *et al.*, 2003). La toxicité induite par l'activation des récepteurs NMDA serait aussi impliquée dans le développement de plusieurs affections neurodégénératives chroniques comme les maladies d'Huntington et de Parkinson, de même que la démence de type Alzheimer (Sanz-Clemente *et al.*, 2013). En ce qui a trait à la maladie

d'Alzheimer, les causes sont encore inconnues, mais les études montrent une plus grande quantité de glutamate dans les neurones (Mattson, 1995). Plusieurs hypothèses sont émises, par exemple le vieillissement rendrait les neurones plus vulnérables à l'action du glutamate ce qui entraînerait l'excitotoxicité dans ces cellules (Mattson, 1995). Aussi, des changements dans la sensibilité des récepteurs au glutamate (AMPA et NMDA) ou encore l'augmentation de la β -amyloïde, une caractéristique pathologique de l'Alzheimer, seraient reliés à l'excitotoxicité du glutamate (Hynd *et al.*, 2004; Mota *et al.*, 2014). Il y a tout de même l'évidence de l'implication des récepteurs NMDA dans plusieurs conditions pathologiques.

La question des liens entre la mort neuronale et l'activation des récepteurs NMDA n'est toutefois pas si simple. En effet, les études sur le sujet laissent croire que les récepteurs du NMDA ne sont pas obligatoirement engagés dans les processus de la destruction neuronale. Alors que les chercheurs les concevaient jadis comme des complexes relativement homogènes, les récepteurs NMDA sont en réalité des protéines hétérogènes présentant une dynamique propre et faisant intervenir des mécanismes pouvant contribuer à la mort des neurones certes, mais également à l'activation des processus neuroprotecteurs (Hardingham et Bading, 2003). De ce point de vue, les chercheurs ont démontré que la composition moléculaire des récepteurs NMDA est à même de conditionner l'action du glutamate sur les neurones. La section qui suit mettra en lumière l'importance jouée par l'organisation moléculaire des récepteurs NMDA sur le plan neuropathologique.

1.2.2 L'hétérogénéité des récepteurs NMDA : Une clé pour comprendre les maladies neurodégénératives

Parmi les approches pharmacologiques susceptibles de réduire la dégénérescence neuronale dans diverses affections neurodégénératives figurent les antagonistes des récepteurs NMDA. Or, les données recueillies chez des animaux transgéniques déficients en ces récepteurs semblent indiquer que l'abolition de la fonction NMDA peut s'avérer également nuisible pour la survie des neurones (Ikonomidou *et al.*, 1999; Tashiro *et al.*, 2006). Un paradoxe qui pourrait s'expliquer par la complexité moléculaire

des récepteurs NMDA. On dénombre, à ce jour, sept sous-unités protéiques susceptibles de former les récepteurs NMDA (NR1, NR2A à D et NR3A-B). Les récepteurs NMDA sont des tétramères composés généralement de deux sous-unités obligatoires NR1 et de deux autres sous-unités soit NR2 ou NR3, et même parfois les deux (Sanz-Clemente *et al.*, 2013). Le récepteur, ainsi constitué, forme un canal cationique qui laisse passer le sodium, le potassium et le calcium, lorsqu'activé. L'ouverture du canal est due à la liaison de la glycine, un co-agoniste, sur la sous-unité NR1, combinée au glutamate sur NR2 (Lau et Tymianski, 2010).

La répartition des récepteurs NMDA dans les différentes régions du cerveau varie selon les sous-unités du récepteur. Par exemple, la sous-unité NR2A est omniprésente dans le cerveau, tandis que NR2C serait préférentiellement située au niveau du cervelet (Waxman et Lynch, 2005). L'hippocampe est la région du cerveau la plus enrichie en récepteurs NMDA qui sont principalement composés des sous-unités NR2A et NR2B (Danysz *et al.*, 1995). La finesse de leur organisation moléculaire confère aux récepteurs des fonctions diverses. Par exemple, lors du développement, des expériences montrent que des souris n'exprimant pas le récepteur NR1/NR2B ne sont pas viables à la naissance (Wang *et al.*, 2011). Sur le plan de l'excitotoxicité, les chercheurs ont démontré que les effets délétères du glutamate découlent principalement de l'activation des récepteurs NMDA composés des sous-unités NR1/NR2B dans les neurones de l'hippocampe. Ces récepteurs seraient préférentiellement localisés dans les segments extrasynaptiques de l'arborisation dendritique des neurones et contribueraient à l'excitotoxicité par l'activation de différents signaux de mort cellulaire (Hardingham et Bading, 2010). Conformément à cette hypothèse, des chercheurs ont récemment mis en évidence que l'activation des récepteurs NR1/NR2B induit la mort neuronale en favorisant une libération intracellulaire de calcium des réserves mitochondriales (Choo *et al.*, 2012). D'autres études ont aussi démontré que la diminution de l'activité de ces récepteurs, par déphosphorylation de NR1/NR2B, prévient les effets toxiques sur les cellules nerveuses (Farinelli *et al.*, 2012).

Les récepteurs composés des sous-unités NR2A seraient situés, quant à eux, dans le segment synaptique, où s'effectue la communication rapide de l'influx nerveux. Ils auraient comme bénéfice de favoriser l'activation de processus neuroprotecteurs. Les études tendent effectivement à démontrer que l'activation continue de ces récepteurs serait indispensable au maintien des mécanismes requis pour la survie cellulaire. Les récepteurs synaptiques amélioreraient la santé mitochondriale, la suppression de l'activité des caspases, ainsi qu'une augmentation des défenses antioxydantes (Papadia *et al.*, 2008; Hardingham et Bading, 2010). Sur le plan mécanistique, de nombreuses observations biochimiques permettent d'établir la relation entre le degré de survie cellulaire et le niveau d'expression d'un facteur de transcription la protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMPc (CREB). Cette protéine, lorsqu'activée par sa phosphorylation, contribue à la synthèse de plusieurs gènes au maintien de l'intégrité fonctionnelle de la cellule, mais aussi dans les processus comme la plasticité synaptique et dans l'apprentissage et la mémoire (Papadia et Hardingham, 2007). Il a été mis en évidence que l'activation des récepteurs NMDA formés des sous-unités NR1/NR2A accentue la phosphorylation de CREB et ainsi favorise la survie cellulaire (Hardingham et Bading, 2003; Papadia et Hardingham, 2007; Hardingham et Bading, 2010). À l'encontre, la stimulation des récepteurs extrasynaptiques NR1/NR2B inhiberait la phosphorylation de ce facteur de transcription et rendrait, donc, les cellules plus vulnérables aux dommages traumatiques (Hardingham *et al.*, 2002; Ivanov *et al.*, 2006; Karpova *et al.*, 2013). Schématiquement les récepteurs NMDA peuvent donc se présenter en deux grandes familles, la famille synaptique NR2A susceptible de conférer un état neuroprotecteur et la famille extrasynaptique NR2B considérée davantage toxique pour le cerveau (Figure 1.1).

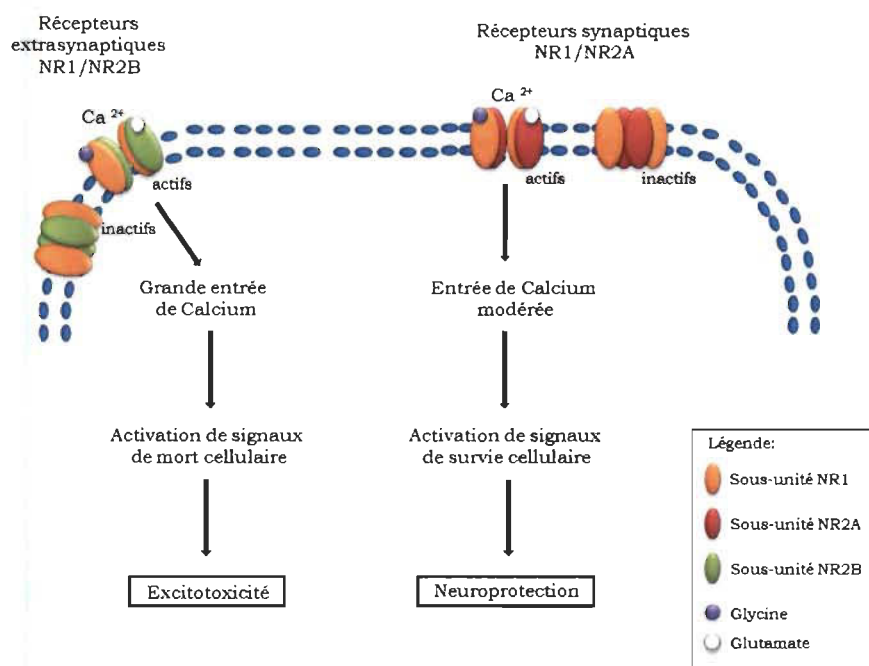


Figure 1.1 La dichotomie des récepteurs NMDA.

Les principaux récepteurs NMDA de l'hippocampe ont une localisation différente dans la synapse, soit extrasynaptique, pour les NR1/NR2B et synaptique pour les NR2A. À la suite de leur activation, par la liaison du glutamate avec le co-agoniste glycine, les canaux cationiques s'ouvrent et laissent entrer un influx de calcium. La composition du récepteur fait varier l'entrée de calcium dans la cellule selon certains facteurs comme la rapidité d'ouverture du canal ou encore le temps de désactivation (Erreger et al., 2005). Il ressort que les récepteurs NR2B laisseraient entrer une plus grande quantité de calcium qui pourrait alors activer des mécanismes sous-jacents de la toxicité. À l'opposé de la neuroprotection des récepteurs NR2A par une entrée de calcium plus restreinte.

Les observations de plusieurs chercheurs plaident en faveur que les récepteurs NMDA, composés des sous-unités NR1/NR2A, pourraient s'avérer jouer un rôle de protection pour les cellules nerveuses. Un rôle qui s'étendrait aussi à la protéine Tau, en limitant sa phosphorylation et ainsi diminuer les effets nocifs associés à cette protéine (Allyson *et al.*, 2010). La protéine Tau joue des rôles importants dans la cellule, mais est considérée comme dommageable dans certaines conditions pathologiques. La prochaine section est consacrée à la description de la protéine Tau et ses rôles physiologiques au sein de la cellule. Elle traitera également de son implication dans certaines pathologies neurodégénératives.

1.3 La protéine Tau : isoformes et phosphorylation

La protéine Tau joue des rôles fondamentaux dans le maintien de l'intégrité fonctionnelle de la cellule, particulièrement dans le transport axonal, et ce, par la régulation de la dynamique microtubulaire au sein du cytosquelette. Elle est également requise lors de la croissance des dendrites, ainsi que pour l'ancrage de certaines enzymes membranaires (Gong *et al.*, 2006; Gendron et Petrucelli, 2009). Chez l'humain, le gène de Tau est d'environ 100 kilobases (kb), constitué de 16 exons et situé sur le chromosome 17 (Buee *et al.*, 2000). L'épissage alternatif de l'ARN messager (ARNm) entraîne la synthèse de six différents isoformes de la protéine selon la présence ou l'absence de trois insertions (Figure 1.2). L'expression de ces isoformes varie selon le développement. En effet, à l'âge adulte, les six isoformes sont présentes chez l'homme alors que le fœtus n'exprime que l'isoforme la plus courte (Spillantini et Goedert, 1998).

Les isoformes de Tau peuvent aussi avoir différentes localisations dans la cellule. De façon majoritaire, Tau est retrouvée dans l'axone du neurone. Cependant, la protéine peut se localiser dans différents compartiments cellulaires et en conséquence avoir des fonctions différentes (Gendron et Petrucelli, 2009; Sultan *et al.*, 2011). En effet, la protéine a d'abord été identifiée dans l'axone pour son rôle dans la régulation des microtubules et du transport axonal (Weingarten *et al.*, 1975), mais il a récemment été découvert qu'elle pourrait aussi se situer dans le noyau (Sjoberg *et al.*, 2006). La protéine Tau serait importante dans l'organisation nucléolaire et même dans la protection de l'ADN lors de certaines conditions (Sultan *et al.*, 2011). Pour ce qui est du compartiment somatodendritique, les protéines Tau s'y retrouvent en grande quantité dans des conditions pathologiques où elles jouent un rôle nocif (Khatoon *et al.*, 1994; Mandelkow et Mandelkow, 1998). Des études mettent en évidence que la protéine Tau dendritique a pour effet potentiel de favoriser la livraison d'une protéine kinase de la famille des Src (la protéine Fyn) au niveau des récepteurs membranaires de type NR2B, favorisant ainsi le processus d'excitotoxicité (Ittner *et al.*, 2010; Trepanier *et al.*, 2012).

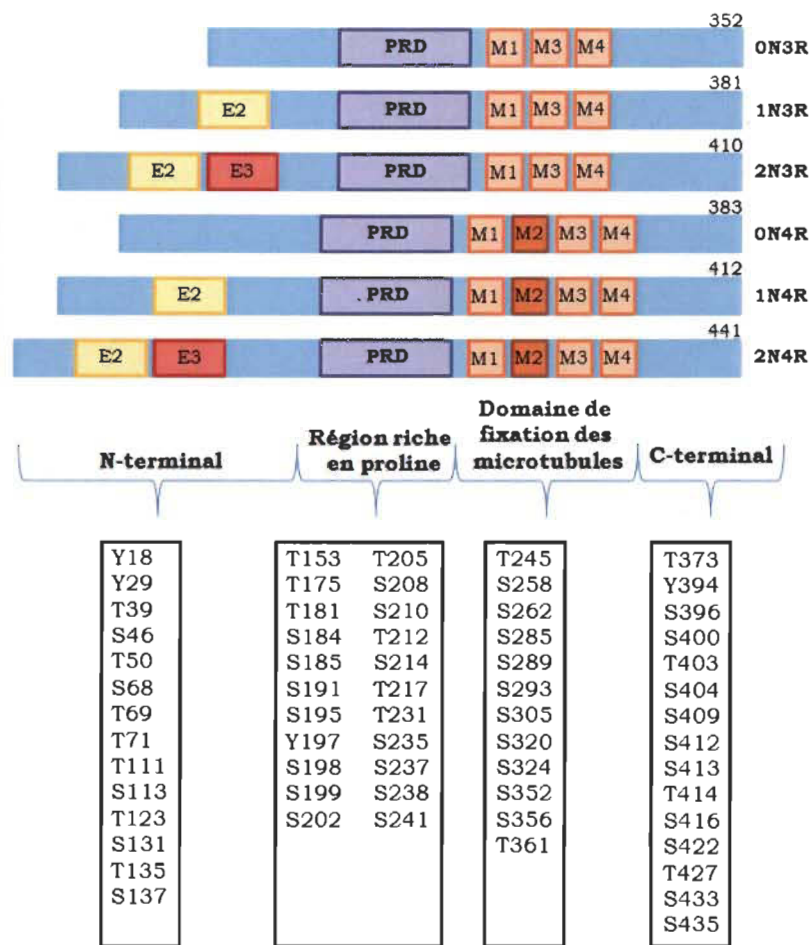


Figure 1.2 La protéine Tau et ses isoformes.

À la suite de l'épissage alternatif, le gène de la protéine Tau se traduit en 6 isoformes. Ces isoformes sont différentes par l'absence ou la présence d'un ou deux insertions N-terminal codé par l'exon 2 (boîte jaune) et 3 (boîte rouge) ainsi que la présence de trois ou quatre régions de répétitions codées par les exons 9, 11 et 12 (boîtes oranges pâles) et 10 (boîte orange foncé) dans la partie C-terminal. La protéine est divisée en quatre régions distinctes comprenant la région C-terminale, riche en proline, de fixation des microtubules et N-terminal offrant plus de 80 sites de phosphorylation.

La phosphorylation de la protéine Tau est la principale modification post-traductionnelle qui ajuste le fonctionnement du système microtubulaire. Ce changement permet à la protéine d'être plus ou moins attachée aux microtubules (Buee *et al.*, 2000). Si la protéine est davantage phosphorylée, elle pourra se détacher des microtubules, alors que le contraire la retient plus fortement au cytosquelette. Au cours du

développement, un état d'hyperphosphorylation transitoire de Tau, par rapport à celle de l'adulte, confère un meilleur dynamisme au cytosquelette pour laisser place à la formation du réseau microtubulaire et la croissance des prolongements nerveux (Buee *et al.*, 2000; Wang et Liu, 2008).

La protéine Tau possède plus de 80 sites de phosphorylation qui chacun de façon indépendante peuvent être phosphorylé et déphosphorylé. La modification de la phosphorylation de chaque site peut avoir des fonctions différentes sur la protéine. Certaines régions de la protéine modifient particulièrement l'affinité entre elle et les microtubules. Par exemple, la région riche en proline, lorsque phosphorylée, favorise la dépolymérisation des microtubules. Aussi, des sites de phosphorylation dans la région de fixation des microtubules, comme la Ser262 et Ser356, modulent fortement l'interaction avec le cytosquelette (Gendron et Petrucelli, 2009; Alonso *et al.*, 2010) (Figure 1.2). Comme mentionné précédemment, la protéine Tau peut se retrouver dans différents compartiments cellulaires. C'est par la modification de son état de phosphorylation qu'elle aurait la possibilité de se déplacer. D'ailleurs, lorsque la protéine Tau se trouve dans le compartiment dendritique, elle présenterait un niveau de phosphorylation plus élevé (Hoover *et al.*, 2010; Zempel *et al.*, 2010).

1.3.1 Les enchevêtrements neurofibrillaires et la protéine Tau

La phosphorylation, bien que nécessaire au dynamisme du cytosquelette, peut entraîner un état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau lors de conditions pathologiques et causer des dommages aux neurones. En effet, lors d'une hyperphosphorylation de la protéine Tau, celle-ci se détache des microtubules, s'agrège et se conforme en filaments appariés en hélice (PHF, sigle de l'anglais « paired helical filament »). Ultimement, ils finissent par former des amas de neurofibrilles (« tangles » en anglais) causant une neurodégénérescence progressive (Martin *et al.*, 2011) (Figure 1.3). Les substances nécessaires au bon fonctionnement des neurones sont normalement acheminées par l'intermédiaire des microtubules. La protéine Tau se liant à ces fibres constitutives du cytosquelette, il est logique de penser que son action pathogène peut alors s'exercer par

le moyen d'un effet sur le transport axonal. Un dysfonctionnement de ce système est effectivement confirmé par plusieurs recherches (Lee *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Ces enchevêtrements neurofibrillaires sont présents dans plusieurs démences, nommées tauopathies. Les tauopathies constituent un large groupe de pathologies neurodégénératives parmi lesquelles figure la maladie d'Alzheimer, mais aussi d'autres comme la maladie de Pick et la paralysie progressive supranucléaire (Chohan et Iqbal, 2006; Lee *et al.*, 2011).

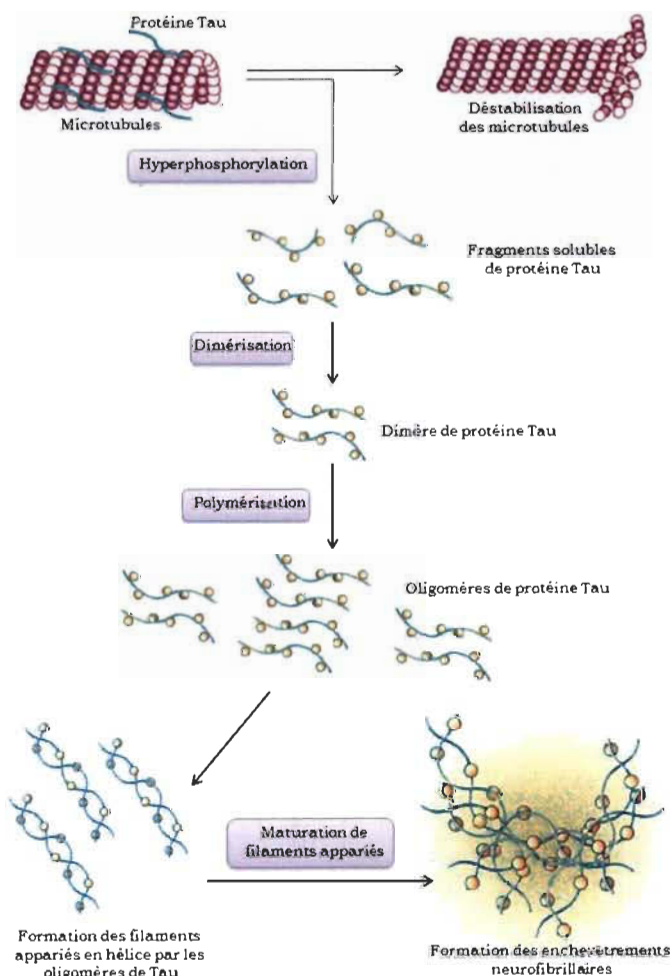


Figure 1.3

La dégénérescence neurofibrillaire.

Physiologiquement, des protéines Tau se détachent périodiquement des microtubules qui sont remplacés et rapidement dégradés. Lorsqu'il y a une accumulation inhabituelle de phosphate sur certains sites, les protéines Tau se détachent des microtubules et s'accumulent dans le cytosol. Les protéines Tau s'enroulent alors l'une autour des autres pour former les filaments appariés en hélice.

On trouve plus de 80 sites de phosphorylation sur la protéine Tau, dont environ une trentaine sont reconnus pour être phosphorylés seulement lors de la formation des filaments appariés et non dans les cerveaux sains (Gong *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2013b). La protéine Tau possède quatre régions distinctes, soit N-terminal, la région riche en proline, le domaine de fixation des microtubules, ainsi que C-terminal (Figure 1.2). Selon la région, la modulation des différents sites peut entraîner des changements variés sur la protéine et dans le neurone. Plusieurs études ont démontré l'importance au sein de la cellule de certains de ces sites, dont Ser199-202, Ser262 et Ser396-404. Récemment, Shahpasand et ses collaborateurs ont publié que la phosphorylation des sites Ser199-202 affecte le transport mitochondrial par un changement d'espace entre les microtubules (Shahpasand *et al.*, 2012). Ce transport est crucial pour le bon fonctionnement du transport axonal, mais aussi pour la répartition uniforme de l'énergie et du calcium selon la demande, par exemple pour la croissance dendritique. D'ailleurs, il semblerait que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans les maladies neurodégénératives afflige d'abord les sites Ser199-202 (Maurage *et al.*, 2003; Luna-Munoz *et al.*, 2007). L'hyperphosphorylation de ces sites représente l'une des premières anomalies biochimiques susceptibles de contribuer à la pathologie neurofibrillaire. Les acides aminés Ser199-202 semblent être primordiaux pour le bon fonctionnement de la protéine (Maurage *et al.*, 2003) et seront les sites étudiés principalement dans notre étude.

Rappelons-le, la protéine Tau possède d'autres sites de phosphorylation connus pour réguler son fonctionnement, comme l'attachement aux microtubules. La Ser262 serait l'un de ces sites qui, lorsque phosphorylée, inhibe la fixation de la protéine Tau aux microtubules et ainsi perturbe le réseau de filaments (Alonso *et al.*, 2010). Pour leur part, les sites Ser396-404 entraîneraient la formation de la protéine Tau en PHFs (Gong *et al.*, 2006). Ces sites seraient hyperphosphorylés plus tardivement dans les étapes de l'agrégation de Tau et sont d'ailleurs associés aux stades avancés des tauopathies (Maurage *et al.*, 2003; Luna-Munoz *et al.*, 2007). Il apparaît donc évident que l'état de phosphorylation de certains sites de la protéine Tau s'avère crucial pour son bon

fonctionnement. Nous verrons évidemment à présenter dans la section qui suit les mécanismes susceptibles de moduler l'état de phosphorylation de Tau.

1.3.2 La régulation de la phosphorylation de la protéine Tau

Les protéines kinases sont connues pour affecter la phosphorylation des protéines Tau. Parmi les plus communes, citons les protéines kinases dirigées contre les motifs riches en proline (les PDPK); comme les kinases dépendantes des cyclines (cdk), la glycogène synthase kinase-3 (GSK3) et enfin la famille des kinases capable de favoriser la phosphorylation des protéines associées aux microtubules (les MAP-kinases) comme ERK et p38 MAPK. Certaines kinases ne ciblant pas les motifs riches en proline (les non-PDPK) sont également connues et comprennent; les kinases régulatrices des microtubules (MARK), la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC) et la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (CAMKII) (Martin *et al.*, 2013b). Outre les kinases, des enzymes déphosphorylantes comme les phosphatases (PP) 1, 2A, et 2B semblent essentielles pour assurer le contrôle de Tau (Liu *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2013a).

Parmi les nombreuses enzymes susceptibles de modifier la phosphorylation de Tau, les chercheurs s'intéressent depuis plusieurs années aux rôles de la GSK3. La GSK3 est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire contribuant au fonctionnement des voies de signalisations cellulaires diverses. Deux isoformes de GSK3 sont présentes dans le cerveau (c.-à-d. GSK3 α et GSK3 β). La kinase GSK3 assure de multiples fonctions, dont la prolifération cellulaire et bien sûr le métabolisme du glycogène. Elle contribue également au développement et à la croissance neuronale (Salcedo-Tello *et al.*, 2011; Bradley *et al.*, 2012). La GSK3, plus particulièrement l'isoforme β , interviendrait dans l'apparition du phénomène de LTP de la transmission synaptique dans l'hippocampe. En effet, l'induction de la LTP semble altérée dans des souris transgéniques qui montrent une surexpression en GSK3 β (Hooper *et al.*, 2007). De plus, GSK3 β semble être une kinase majeure sur la modulation de la phosphorylation de la protéine Tau, puisqu'elle peut phosphoryler près de la moitié des sites répertoriés (Voss

et Gamblin, 2009; Martin *et al.*, 2013b). De fait, il ressort de plusieurs études que la suractivation de GSK3 β mène à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Lucas *et al.*, 2001; Hernandez *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2013b). D'autant plus si cette kinase n'est pas régulée, elle peut être impliquée dans la mort neuronale et ainsi jouer un rôle important dans différents désordres neurodégénératifs. La GSK3 serait d'ailleurs suractivée ou encore surexprimée dans la maladie d'Alzheimer (Blalock *et al.*, 2004; Leroy *et al.*, 2007; Hooper *et al.*, 2008).

La régulation de l'activité de GSK3 se fait par l'intermédiaire de la phosphorylation de certains sites sur la kinase. Parmi ces sites, le plus connu et le plus important est la serine 9. L'activité de GSK3 β diminue en fonction de l'augmentation de la phosphorylation de Ser9. Au contraire de ce site, plus la phosphorylation de la tyrosine 216 est élevée, plus l'activité de la kinase augmente également (Salcedo-Tello *et al.*, 2011). Il est donc possible d'évaluer le niveau d'activité de GSK3 β en observant la phosphorylation de ces sites. Plusieurs kinases sont identifiées à ce jour comme étant des intervenants possibles dans la régulation de GSK3 β , dont la cdk5, la PKC, la p38 MAPK, ainsi que la voie PI3K/Akt. De plus, certaines phosphatases, comme PP1, pourraient aussi réguler GSK3 β (Bradley *et al.*, 2012) (Figure 1.4).

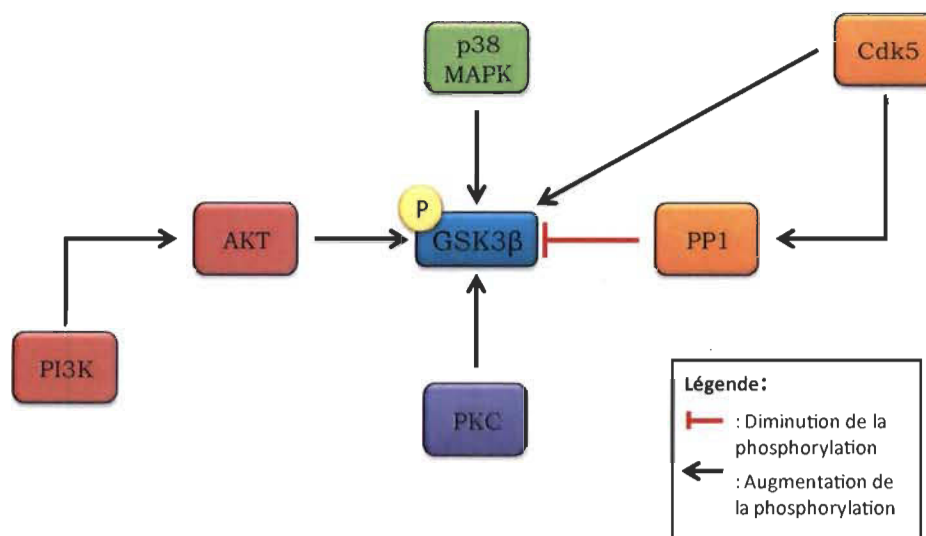


Figure 1.4 La régulation de la protéine kinase GSK3β.

La régulation de GSK3β se fait par la modulation de la phosphorylation de la protéine. Plusieurs kinases et phosphatases sont impliquées dans cette régulation, dont certaines, particulièrement importantes, seront étudiées dans le présent mémoire. Les kinases PKC, Cdk5 et PI3K/Akt vont aller phosphoryler la Ser9 de GSK3β si elles sont actives. La phosphorylation de la Ser9 GSK3β peut aussi être diminuée par la phosphatase PP1. Pour sa part, la kinase p38MAPK va phosphoryler un autre site de GSK3β, la Ser389. La phosphorylation de ces sites, Ser9 et Ser389, indique une diminution de l'activité de GSK3β.

1.4 Relation entre les récepteurs NMDA et la protéine Tau

Alors qu'il existe d'évidentes corrélations entre les récepteurs NMDA et l'activation des processus susceptibles de modifier les activités kinasiques dans le tissu nerveux (Bradley *et al.*, 2012; Bartlett et Wang, 2013), nous manquons de données sur les rôles joués par les sous-unités NR2A et NR2B au niveau de la protéine Tau. Une étude fait état d'une réduction de la phosphorylation de la protéine Tau par les récepteurs NMDA, mais elle documente que très peu l'effet apporté sur les différentes isoformes de cette protéine, l'implication des sous-types de récepteurs NMDA et les kinases en cause (Fleming et Johnson, 1995). Une autre étude effectuée sur des neurones embryonnaires montre toutefois que l'activation des récepteurs NMDA est en mesure de favoriser un état d'hyperphosphorylation de Tau (Rahman *et al.*, 2009). Avec le recul, la perspective d'une régulation différentielle de Tau par les sous-unités NR2 formant

les récepteurs a fait son chemin. Il apparaît, selon toute vraisemblance, que les récepteurs NR2A exercent des effets moléculaires spécifiques capables d'enrayer l'hyperphosphorylation de Tau induite par les récepteurs NR2B (Allyson *et al.*, 2010), une hypothèse que nous comptons vérifier dans le cadre du présent mémoire.

CHAPITRE II

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Début des années 90, des chercheurs réalisent qu'il existe une relation entre l'activation des récepteurs NMDA et la phosphorylation de la protéine Tau (Bigot et Hunt, 1990; Sindou *et al.*, 1994; Couratier *et al.*, 1996). Dans une culture de neurones humains, la littérature indique la possibilité que la suractivation des récepteurs NMDA dans les neurones immatures contribue à l'hyperphosphorylation de Tau (Rahman *et al.*, 2009). Ce que nous savons des neurones immatures, c'est qu'ils expriment avec prédominance les récepteurs formés des sous-unités NR2B. Or, dans les neurones matures, l'expression des récepteurs NR2B diminue considérablement, à la faveur de l'expression des récepteurs NR2A (Hardingham et Bading, 2003; Papadia et Hardingham, 2007; Sanz-Clemente *et al.*, 2013). Or, la présente étude vise à identifier si l'expression préférentielle des récepteurs NR2A dans le tissu mature contribue à modifier l'influence NMDA sur Tau, et ce, à la faveur du processus de déphosphorylation. Dans cette perspective, le présent mémoire s'efforcera de répondre aux questions suivantes :

Est-ce que la phosphorylation de la protéine Tau est modulée à la baisse à la suite de l'activation des récepteurs NMDA dans les neurones matures de l'hippocampe?

Les données préliminaires obtenues dans le cadre de ce mémoire laissent croire que l'activation des récepteurs NMDA dans le tissu mature enclenche une baisse substantielle de la phosphorylation de Tau aux sites Ser199-202 dans l'hippocampe de rats âgés entre 8 et 10 semaines. Dans une première série d'expériences faisant appel à la technique d'immunobuvardage de type Western, il sera tenté de vérifier si cette baisse de phosphorylation implique (ou non) des changements d'expression de la protéine Tau, et ce, lors de l'activation dose-dépendante des récepteurs NMDA. Une emphase sera également portée sur l'analyse des effets du NMDA sur les différentes isoformes de Tau

trouvées dans les neurones de l'hippocampe. Les isoformes de Tau sont distribuées dans des compartiments cellulaires distincts et il est raisonnable de proposer que l'effet apporté soit variable selon les protéines Tau. Or, la capacité du NMDA à réguler la phosphorylation du site Ser199-202 sur les différentes isoformes de Tau sera analysée.

Est-ce que l'activation des récepteurs NMDA peut déphosphoryler d'autres sites de la protéine Tau?

Pour explorer davantage le lien entre l'activation des récepteurs NMDA et la protéine Tau dans l'hippocampe adulte, une série d'expériences sera réalisée afin de vérifier si la baisse de phosphorylation de Tau peut s'étendre à d'autres sites. Comme mentionné antérieurement, les protéines Tau possèdent plus de 80 sites de phosphorylation différents, lesquels sont répartis dans les quatre régions de la protéine. Or, les expériences prévues verront à établir si l'état de déphosphorylation aux sites Ser199-202 induite par le NMDA implique aussi des changements de phosphorylation dans deux autres domaines de la protéine. C'est dans ce contexte qu'on évaluera les niveaux de phosphorylation des résidus Ser262 et Ser404, des sites reconnus pour affecter la liaison de Tau avec le système microtubulaire et les membranes cellulaires.

Est-ce que la déphosphorylation de Tau implique l'activation sélective des récepteurs synaptiques NR2A?

Selon les thèses neurobiologiques les plus en vogue, le statut de la protéine Tau serait étroitement lié au niveau d'activation des récepteurs NMDA. Une étude menée par Julie Allyson dans notre laboratoire en 2009 démontre que l'hypoactivité des récepteurs NR2A du glutamate favorise le développement d'un état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Pour approfondir cette question, des études ont été réalisées afin de valider, d'une part, que l'inhibition sélective des récepteurs NR2B extrasynaptiques résiduels soit à même d'exacerber la capacité du NMDA à déphosphoryler la protéine Tau dans l'hippocampe mature. En parallèle, la présente recherche s'est également intéressé à l'hypothèse que le blocage pharmacologique des récepteurs synaptiques NR2A serait susceptible de favoriser, comme dans le tissu immature, une

hyperphosphorylation de la protéine Tau. Pour atteindre cet objectif, les hippocampes de rats seront exposés à des antagonistes pharmacologiques connus pour bloquer les récepteurs NR2B (RO) et NR2A (NVP).

Est-ce que la déphosphorylation de Tau implique l'inactivation de l'enzyme GSK3 β par une signalisation spécifique?

La GSK3 β a été identifiée comme étant une des principales kinases impliquées dans la phosphorylation de plusieurs sites de la protéine Tau, dont les sites Ser199-202. La présente étude a donc cherché à savoir si la baisse de phosphorylation de Tau induite dans les neurones matures implique une baisse d'activité de l'enzyme GSK3 β . Pour ce faire, le niveau de phosphorylation des sites Ser9 et Tyr216 a été mis au cœur des recherches, deux épitopes étant susceptibles de modifier l'activité GSK3 β . Sachant que l'inactivation de l'enzyme GSK3 β par le NMDA se caractériserait par une hausse de phosphorylation sur la Ser9 et/ou une baisse de phosphorylation sur la Tyr216, il sera intéressant de déterminer le ou les partenaires biochimiques susceptibles de réguler l'activité de GSK3 β et, conséquemment, la phosphorylation de Tau. Nous faisons référence ici aux partenaires classiques de GSK3 β comme les systèmes de phosphorylation Akt/PKB, PI3K, Cdk5 et PKC.

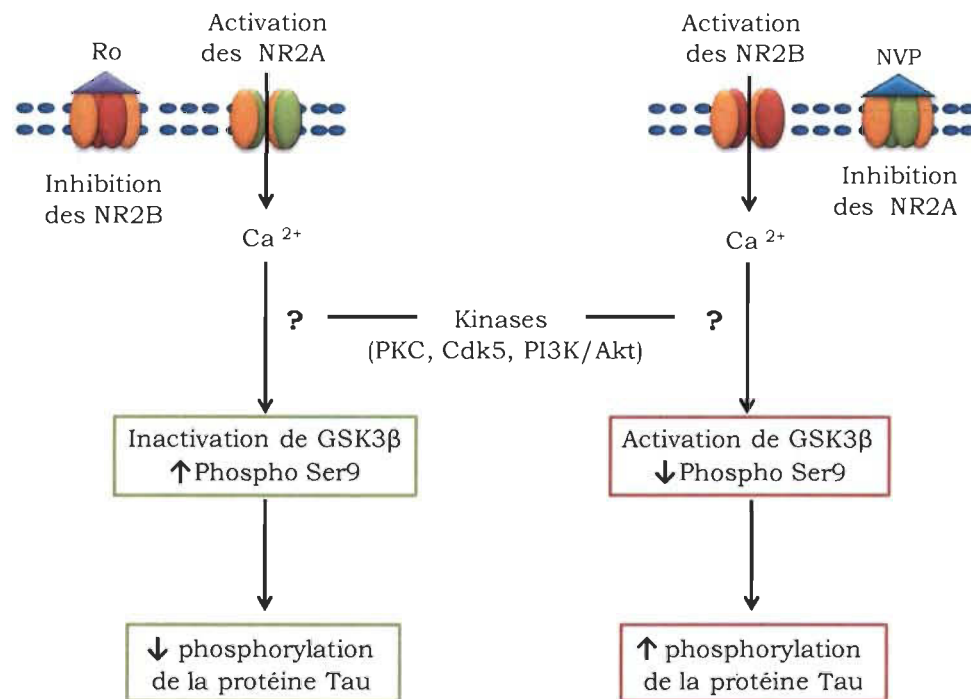


Figure 2.1 Schéma des hypothèses

Voici une représentation des résultats attendus pour les hypothèses présentées. L'activation des récepteurs NR2A ou NR2B pourrait influencer différemment la phosphorylation de la protéine Tau par la modulation de la kinase GSK3β et d'autres kinases que nous tenterons d'identifier.

2.1 Originalité de la recherche proposée

À l'origine, les caractéristiques pharmacologiques des récepteurs NMDA laissaient entrevoir une relative simplicité quant au traitement de maladies neurodégénératives impliquant le processus d'excitotoxicité glutamatergiques. De toute évidence, les données recueillies par de nombreux experts tentent à démontrer que les choses se compliquent à ce sujet. En utilisant l'hippocampe comme modèle d'étude et la protéine Tau comme cible cellulaire, le présent travail devrait nous en apprendre davantage sur l'implication des familles réceptrices NR2A et NR2B dans le contrôle de Tau. À terme, les résultats obtenus pourraient s'avérer essentiels pour la mise en œuvre de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant préférentiellement les situations pathologiques se caractérisant par un état d'hyperphosphorylation de cette protéine.

CHAPITRE III

MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

Les substances pharmacologiques et les protocoles expérimentaux requis pour répondre aux grands objectifs précédemment énoncés sont décrits dans l'article qui constitue le cœur de ce mémoire. Pour le lecteur, il s'avère toutefois important de préciser les caractéristiques pharmacologiques des antagonistes des récepteurs NMDA, ainsi que les généralités concernant l'utilisation du modèle de tranches d'hippocampe.

3.1 Les antagonistes des récepteurs NMDA

Nombre d'études portant sur les fonctions des récepteurs NMDA ont été effectuées à l'aide des antagonistes généraux comme l'AP-5 et le MK801. Au fil du temps, des antagonistes ciblant plus spécifiquement les différents types de récepteurs NMDA ont été développés. En effet, il est maintenant possible d'inactiver préférentiellement les récepteurs NR2B par un composé nommé RO25-6981 (RO), et ce, à une concentration de 1 μ M. Il est important de noter que dépasser une certaine concentration, le produit pourrait ne plus être sélectif aux récepteurs désirés (Traynelis *et al.*, 2010). Pour ce qui est des récepteurs NR2A, la compagnie NOVARTIS a développé le NVP-AAM077 (Auberson *et al.*, 2002), un antagoniste sélectif bloquant l'activation de ces récepteurs à une concentration de 50 nM (Martel *et al.*, 2009). Les concentrations choisies pour ces deux antagonistes sont basées sur la littérature afin d'avoir la meilleure efficacité sans outrepasser la sélectivité du produit. La structure chimique des molécules utilisées est présentée dans la Figure 3.1.

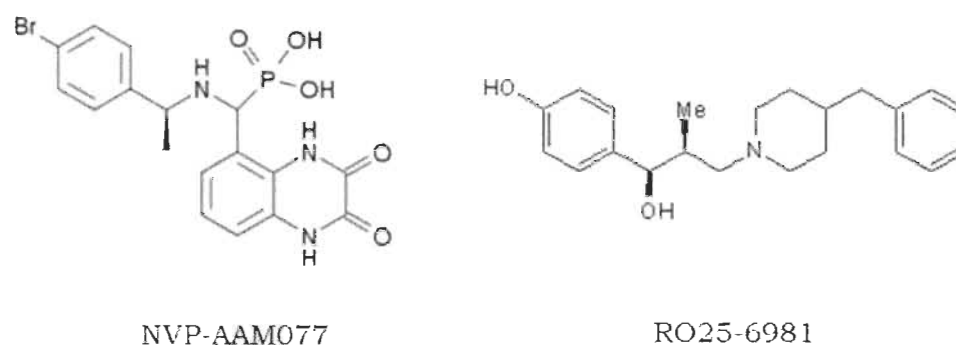


Figure 3.1 Les antagonistes des récepteurs NMDA.

Le NVP est un antagoniste relativement propre aux récepteurs NMDA composés des sous-unités NR1/NR2A alors que RO est plutôt l'apanage des récepteurs formés des sous-unités NR1/NR2B.

3.2 Les tranches d'hippocampe de rats

Toutes les expériences, afin d'observer la modulation de la phosphorylation de la protéine Tau, sont réalisées dans une préparation de tranches d'hippocampe de rats. Il est possible, à l'aide de cette préparation, d'examiner une panoplie de processus physiologiques, dont le comportement électrophysiologique des cellules, ainsi que divers phénomènes de plasticité fonctionnelle que sont la potentialisation et la dépression à long terme de la transmission synaptique. La méthode consiste essentiellement à maintenir en vie pendant plusieurs heures les neurones hippocampiques en plaçant de minces tranches de cette structure du cerveau dans une chambre perfusée par un liquide cébrospinal artificiel (ou ACSF) saturé en oxygène. Il faut d'abord que l'animal soit soumis à une anesthésie légère, puis décérébré. Le cerveau est ensuite placé dans une boîte de Pétri placée sur la glace afin d'enlever une portion frontale et le cervelet du cerveau et ainsi atteindre la portion d'intérêt contenant l'hippocampe. Le bloc de tissu est finalement collé sur un support à Vibratome avec lequel des coupes frontales du cerveau sont faites, environ entre les bregma -2,28 mm et -4,56 mm (Paxinos et Watson, 2006). Les coupes de cerveau ont une épaisseur de 350 μ M dont les tranches d'hippocampes seront isolées chirurgicalement (Figure 3.2).

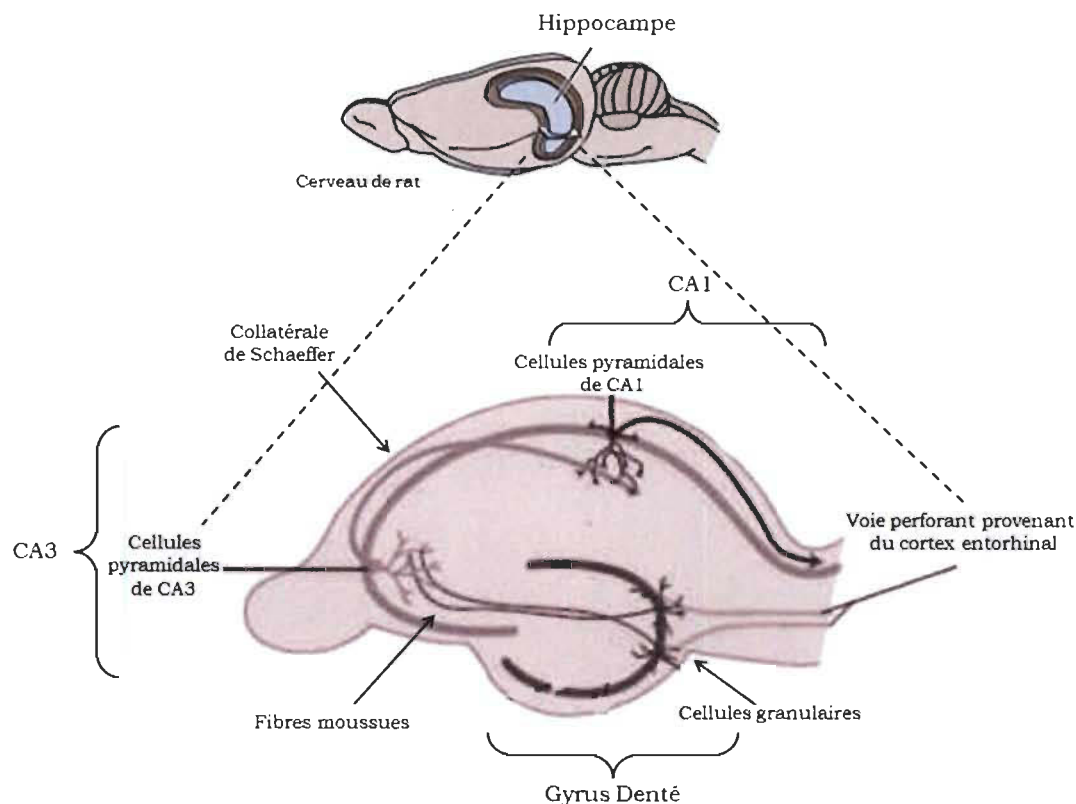


Figure 3.2 Caractéristiques morphologiques des tranches d'hippocampe.

L'hippocampe est souvent considéré comme un carrefour unidirectionnel crucial pour le traitement de l'information. L'entrée des influx nerveux se fait par les projections émanant du cortex entorhinal. Ces projections font synapse avec les neurones du gyrus denté. De cette région partent les fibres moussues qui font synapse avec les dendrites des cellules pyramidales de CA3. Les connexions de l'aire CA3 se ramifient et forment la collatérale de Schaeffer qui fait synapse avec les cellules pyramidales de CA1; ce dernier secteur de l'hippocampe étant particulièrement riche en récepteurs NMDA.

Cette approche expérimentale assure que les régions spécifiques de l'hippocampe gardent leur intégrité fonctionnelle et morphologique. Par exemple, nous savons que les neurones hippocampiques, maintenus dans ces conditions, sont en mesure de conserver leur capacité à induire spontanément des réponses synaptiques glutamatergiques qui impliquent, entre autres, l'activation des récepteurs NMDA. Pour ces raisons, nous avons exploité ce modèle *ex vivo* pour étudier les relations potentielles entre les récepteurs NMDA et la protéine Tau.

CHAPITRE IV

NMDA REDUCES TAU PHOSPHORYLATION IN RAT HIPPOCAMPAL SLICES BY TARGETING NR2A RECEPTORS, GSK3 β AND PKC ACTIVITIES

Le contenu du présent chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *Neural Plasticity*. La référence de cet article est la suivante : *Neural Plasticity*, Volume 2013 (2013), Article ID 261593, 10 pages.

Doi:10.1155/2013/261593

4.1 Contribution des auteurs

L'article scientifique qui constitue le cœur de cet ouvrage a fait l'objet d'une publication parue dans la revue *Neural Plasticity*. Étant première auteure de l'article, j'ai rédigé cet ouvrage suivant les conseils judicieux de la part de mon directeur de recherche, Guy Massicotte. L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette maîtrise est le fruit du travail de recherche expérimental accompli par moi-même et d'autres collaborateurs. De fait, quelques expériences ont été réalisées en collaboration avec Julie Allyson et Ismaël Elhiri afin de m'assister dans l'identification de la voie de signalisation assurant les effets des récepteurs NR2A sur la protéine Tau. De plus, multiples expériences n'auraient été possibles sans la collaboration du professeur Michel Cyr qui nous a permis d'utiliser des appareils d'imagerie financés par son laboratoire. M. Cyr a aussi participé à la réalisation de cet article par ses conseils et ses corrections apportées lors de la rédaction.

4.2 Article scientifique

NMDA Reduces Tau Phosphorylation in Rat Hippocampal Slices by Targeting NR2A Receptors, GSK3 β and PKC Activities

Audrée DE MONTIGNY, Ismaël ELHIRI, Julie ALLYSON,
Michel CYR and Guy MASSICOTTE

Groupe de recherche en neuroscience, Département de biologie médicale,
Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada

Corresponding author's address: Guy Massicotte, Ph.D.

Département de biologie médicale

U.Q.T.R.

C.P. 500 Trois-Rivières, Québec

Canada G9A 5H7

Telephone: (819) 376-5011 ext 3399

Fax: (819) 376-5084

E-mail: Guy.Massicotte@uqtr.ca

Summary

The molecular mechanisms that regulate Tau phosphorylation are complex and currently incompletely understood. In the present study, pharmacological inhibitors were deployed to investigate potential processes by which the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of glutamate receptors modulates Tau phosphorylation in rat hippocampal slices. Our results demonstrated that Tau phosphorylation at Ser199-202 residues was decreased in NMDA-treated hippocampal slices, an effect that was not reproduced at Ser262 and Ser404 epitopes. NMDA-induced reduction of Tau phosphorylation at Ser199-202 was further promoted when NR2A-containing receptors were pharmacologically isolated and was completely abrogated by the NR2A receptor antagonist NVP-AAM077. Compared with non-treated slices, we observed that NMDA receptor activation was reflected in high Ser9 and low Tyr216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 β), suggesting that NMDA receptor activation might diminish Tau phosphorylation via a pathway involving GSK3 β inhibition. Accordingly, we found that GSK3 β inactivation by a protein kinase C (PKC)-dependent mechanism is involved in the NMDA-induced reduction of Tau phosphorylation at Ser199-202 epitopes. Taken together, these data indicate that NR2A receptor activation may be important in limiting Tau phosphorylation by a PKC/GSK3 β pathway and strengthen the idea that these receptors might act as an important molecular device counteracting neuronal cell death mechanisms in various pathological conditions.

Introduction

Over the years, a growing number of reports have revealed that, in contrast to the destructive effects of excessive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activity, synaptic NMDA receptor stimulation under physiological conditions could result in the activation of pro-survival mechanisms in neurons [1-5]. For instance, it appears that tonic activation of NMDA receptors in hippocampal neurons is required for maintaining synaptic stability, through a mechanism involving modulation of dendritic protein synthesis [6]. In fact, it has been proposed that the tonic activity of NMDA receptors is a crucial mechanism regulating calcium mobilization in neurons, as NMDA receptor deprivation rapidly increases the synaptic expression of surface GluR1 subunits and the incorporation of toxic Ca^{2+} -permeable α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors at glutamatergic synapses [7, 8].

Fiumelli et al. [9] demonstrated that suppression of NMDA receptor activity by global antagonists (MK801 or AP5) can interfere with both phosphorylation and solubility of neurofilament subunit M in isolated cortical neurons. In this particular case, neurite outgrowth appears to be promoted by the inactivation of NMDA receptors, suggesting that the basal levels of NMDA receptor activity are crucial for regulating cytoskeleton stability and growth processes. Other data suggest that tonic NMDA receptor activity, in cerebellar granule cells and hippocampal neurons, regulates microtubule-associated protein 2 (MAP2) phosphorylation and neurite growth [10-12], while some authors have shown that activation of NMDA receptors in physiological conditions is capable of influencing Tau phosphorylation in the hippocampal area [9-11, 13]. In healthy neurons, Tau proteins are well-known for their involvement in the outgrowth of neural processes, axonal transport, development of neuronal polarity and maintenance of normal neuron morphology [14-16], whereas many neurodegenerative diseases are characterized by Tau hyperphosphorylation, Tau (mis)localisation in neurons and, consequently, the development of neurofibrillary tangles [17].

Although the detailed molecular mechanisms by which NMDA receptors can regulate both physiological and pathophysiological processes remain to be elucidated, it

has been proposed that NMDA receptor function may be highly dependent on the composition of their subunits, which are heteromeric assemblies of at least one NR1 subunit and various NR2 (A-D) subunits [18-21]. In the hippocampus, extensive evidence indicates that, in the mature stage, pyramidal cells mainly express NMDA receptors containing NR1/NR2A and NR1/NR2B subunits [22, 23]. From a functional perspective, it has been argued by many that physiological NR1/NR2A subunit activation could favour the participation of pro-survival mechanisms, whereas excessive NR1/NR2B subunit stimulation could lead to neuronal cell death by the involvement of various damaging signaling pathways [5, 24, 25].

Using different pharmacological agents, we reported previously that tonic stimulation of NR2A-containing NMDA receptors in hippocampal slices might be a crucial component limiting Tau hyperphosphorylation [26]. To gain further insight into this effect, we investigated how NMDA treatments modify different Tau isoforms at various phosphorylation sites, specifically those recognized by antibodies raised against Ser199-202, Ser262 and Ser404 Tau epitopes. The contribution of different signaling pathways regulating Tau phosphorylation through GSK3 β activity was also examined.

Materials and Methods

Ethics approval

Animal care procedures were reviewed by the Institutional Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières and determined to be in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Animals and pharmacological agents

Male Sprague-Dawley rats (4-5 weeks of age), purchased from Charles River Laboratories (Montréal, QC, Canada), were housed for 1 week in a temperature-controlled room, prior to any experiments, with free access to laboratory chow and water. The selective NR2A antagonist NVP-AAM077 (NVP) was a gift from Dr. Yves Auberson (Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland). The NR2B receptor antagonist RO25-6981 and the Akt/PKB (protein kinase B) inhibitor 10-[4'-(N,N-Diethylamino)butyl]-2-chlorophenoxazine hydrochloride (10-DEBC) were obtained from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA), while the membrane-impermeable calcium chelator 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetra (BAPTA) was procured from BioMol (Plymouth, PA, USA). Inhibitors of protein kinase C (PKC; Chelerythrine chloride), phosphoinositide 3-kinase (PI3K; LY294002), cyclin-dependent kinase 5 (cdk5; Roscovitine) as well as protease and phosphatase inhibitor cocktails were acquired from Calbiochem (San Diego, CA, USA).

Antibodies

Most antibodies reacting with Tau proteins were purchased from AbCam (Cambridge, MA, USA). The mouse polyclonal antibody Tau-5 (dilution 1:500) served to estimate total Tau protein levels in hippocampal extracts, along with rabbit polyclonal antibodies recognizing Tau phosphorylated at Ser199-202 (pSer199-202; dilution 1:1,000), Ser262 (pSer262; dilution 1:1,000), and Ser404 (pSer404; dilution 1:750). Total GSK3 β (dilution 1 μ g/ml), GSK3 β Ser9 (pSer9; dilution 1 μ g/ml), GSK3 β Tyr216

(pTyr216; dilution 1:1,000) and β -actin antibody were also purchased from AbCam. Goat anti-rabbit or goat anti-mouse peroxidase-conjugated antibodies (dilution 1:5,000) and SuperSignal chemiluminescent substrate kits were from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA).

Hippocampal slices and tissue samples

Sprague-Dawley rats were anesthetized by isoflurane inhalation (Baxter Corp., Toronto, ON, Canada) and decapitated. Their brains were quickly removed and placed in cold cutting buffer containing 126 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 2.3 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 25 mM NaHCO_3 and 11 mM glucose, saturated with 95% O_2 /5% CO_2 (pH 7.4). Coronal brain sections of 350 μm , containing the hippocampus, were sliced in a Vibratome Series 1000 tissue sectioning system (Technical Products International, Inc., St. Louis, MO, USA). Sections were then transferred to artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing 126 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1.3 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 25 mM NaHCO_3 and 11 mM glucose, bubbled continuously with 95% O_2 /5% CO_2 at 32°C. The brain sections were pre-incubated for 60 min before pharmacological treatment. After pharmacological treatment, hippocampal slices were dissected from the brain sections and homogenized in ice-cold RIPA lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate and 1 mM EDTA supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails.

Western blotting

Protein levels extracted from rat hippocampus sections were measured by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Protein lysates (40 μg) were electrophoresed on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and nonspecific binding sites were blocked by incubation for 1 hour at room temperature in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 5% bovine serum albumin (BSA fraction V)

purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Then, selected primary antibodies were incubated overnight at 4°C. After several washes with 0.1% Tween 20, the blots were incubated for 1 hour at room temperature in specific secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody solution. Both primary and secondary antibodies were diluted in Tris buffered saline (TBS)/0.1% Tween 20/1% BSA. Immunoreactivity was visualized by chemiluminescence reactions and densitometric scanning with Vision Work LS software (UVP Bioimaging, Upland, CA, USA), and the intensity of the bands was quantified by ImageJ (W.S. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The densitometry data were expressed as relative optical density.

Statistical analysis

The results are expressed as mean±S.E.M. Statistical significance of the changes was determined by Graph Prism version 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ values were considered as statistically significant.

Results

Tau Phosphorylation at Ser199-202 is Reduced by NMDA Treatment: Role of NR2A-Containing Receptors

To further explore the molecular mechanisms by which NMDA receptors might influence Tau phosphorylation, we assessed hippocampal slices kept metabolically active in oxygenated ACSF as model system. Hippocampal slices from rats were first pre-incubated for 1 hour with increasing NMDA concentrations ranging from 2.5 to 50 μ M, and Tau phosphorylation was then processed according to Western blotting procedures. In initial experiments, we observed that the Tau isoform, estimated to be 62 kDa, became progressively less phosphorylated at Ser199-202 residues when exposed to increasing NMDA concentrations. The threshold concentration for reducing Tau phosphorylation at Ser199-202 was in the order of 5 μ M with a maximal effect obtained at 10-50 μ M (Fig. 1). Interestingly, a consistent feature in our experiments was the preferential modulation of Tau isoforms by NMDA, as depicted in Figure 2. NMDA treatments, in obvious contrast to 62- and 56-kDa Tau isoforms, produced no reliable changes in phosphorylation at Ser199-202 residues for the other two isoforms detected and estimated, with the help of molecular weight standards, to be around 44 and 68 kDa.

Tau has been found to possess more than 84 different phosphorylation sites [27-29]. Consequently, we tested whether NMDA treatment also affects other Tau epitopes. Figure 3 shows that pre-incubation of hippocampal slices with 10 μ M NMDA for 1 hour failed to elicit changes in phosphorylation at Ser262 residues, a phosphorylation site positioned in the microtubule-binding domain of Tau proteins. Similarly, Western blotting experiments indicated that phosphorylation of an epitope located in the C-terminal domain of Tau, Ser 404, was not reduced after NMDA receptor activation (Fig. 3).

From a pharmacological perspective, it has been proposed that NR1/NR2A receptor activation could favour the action of pro-survival mechanisms as well as biochemical processes limiting Tau phosphorylation. The possibility that stimulation

of NR2A-containing NMDA receptors is responsible for down-regulating Tau phosphorylation was then considered. Figure 4 illustrates that the ability of NMDA to reduce Tau phosphorylation was further enhanced in slices pre-exposed to the NR2B antagonist. In particular, pre-treatment with RO25-6981 resulted in significant declines of phosphorylation levels of Tau at Ser199-202 with a low NMDA concentration (1 μ M); which normally did not altered phosphorylation levels of Tau at these epitopes. In contrast, we observed that blockade of NR2A receptors with NVP-AAM077, induces Tau phosphorylation at Ser199-202 epitopes. These data are indeed consistent with the notion that, when pharmacologically isolated, NR2A- and NR2B-containing receptors may exert opposite effects on Tau phosphorylation [26].

NMDA-Induced Regulation of Tau Phosphorylation: Role of Calcium and GSK3 β

Because NMDA receptor activation is a critical regulator of calcium permeability in neurons [30-33], we investigated whether NMDA-induced decrease of Tau phosphorylation might, in fact, be dependent on calcium mobilization. We observed that pre-exposure of hippocampal slices to the cell-impermeable form of BAPTA completely blocked the NMDA-induced reduction of Tau phosphorylation at Ser199-202 epitopes (Fig. 5a), indicating that Tau hypophosphorylation after NMDA receptor activation mainly relies on calcium entrance from the extracellular space. The finding that the effect of NMDA is dependent on calcium entrance in hippocampal neurons predicts that down-regulation of Tau phosphorylation at Ser199-202 epitopes could involve inhibition of kinases, such as GSK3 β , known to influence the phosphorylation of these epitopes [34, 35]. Consequently, the effects of NMDA at the protein level and the phosphorylation status of GSK3 β were examined. After NMDA treatment of hippocampal slices, total GSK3 β protein was found to be unchanged, while its phosphorylation status was clearly affected. NMDA not only increased the phosphorylation of Ser9 residues of GSK3 β but also noticeably reduced phosphorylation at the Tyr216 epitope of this kinase, suggesting functional blockage of GSK3 β during NMDA treatment (Fig. 5b).

NMDA-Induced Tau Regulation Relies on PKC Activation

Given that NMDA-induced reduction of Tau phosphorylation seems dependent on GSK3 β inactivation, we investigated whether NMDA receptors can exert their actions via intracellular pathways known to regulate GSK3 β through phosphorylation processes [36]. To assess possible roles of PI3K and Akt/PKB pathways in NMDA-induced reduction of Tau phosphorylation, we tested the inhibitor LY294002 (10 μ M) and 10-DEBC hydrochloride (2.5 μ M), respectively. In these experiments, the inhibitors were applied 30 minutes prior to NMDA exposure to ensure optimal enzymatic inhibition. Figure 6a shows that the ability of NMDA to down-regulate Tau phosphorylation at Ser199-202 residues was not affected by these inhibitors. Similarly, we observed that regulation of Tau phosphorylation by NMDA was minimally altered in slices pre-treated with the cdk5 inhibitor Roscovitine (10 μ M). In contrast, we noticed that the capacity of NMDA to reduce Tau phosphorylation was totally prevented in hippocampal slices pre-incubated with the PKC inhibitor Chelerythrine chloride (1 μ M), indicating that NMDA-induced regulation of Tau phosphorylation probably involves GSK3 β blockade by the PKC system (Fig. 6b). In accordance with this scenario, NMDA-induced enhancement of GSK3 β Ser9 phosphorylation was not further evident in hippocampal slices pre-exposed to this PKC inhibitor (Fig. 7). Notably, NMDA-induced elevation of GSK3 β Ser9 phosphorylation was also abolished in slices pre-exposed to NVP-AAM077 (50 nM), suggesting the contribution of the NR2A subunit (data not shown).

Discussion

Several lines of evidence indicate that NMDA receptor activation is associated with dephosphorylation of cytoskeletal proteins [9, 11]. For instance, it has been proposed that tonic NMDA receptor stimulation plays a crucial role in limiting MAP2 phosphorylation in hippocampal slices through a mechanism involving stimulation of the calcium/calmodulin-dependent phosphatase, to be PP2B or calcineurin [11, 13]. In this study, we demonstrated that NMDA receptors are also inclined to reduce the phosphorylation levels of Ser199-202 epitopes of 56- and 62-kDa Tau isoforms, an effect which probably implicates calcium entrance in hippocampal neurons through NR2A receptors and subsequent GSK3 β inactivation.

Several signaling pathways, including calcium-dependent ones, have been identified as regulators of the Ser9 phosphorylation state of GSK3 β , a site which tightly controls both enzymatic activity and other GSK3 β phosphorylation sites, such as Tyr216 [36, 37]. Along this line, Ortega et al. observed that GSK3 β activity is down-regulated after NMDA treatment of cerebellar granule neurons by mechanisms involving GSK3 β hyperphosphorylation at the Ser9 residue [38]. According to our results, NMDA-induced reduction of Tau phosphorylation was coupled with decreased GSK3 β activity and, from a mechanistic perspective, we demonstrated that this effect is possibly dependent on calcium mobilization. The exact mechanisms by which calcium could reduce GSK3 β activity remain to be clarified, but the existence of pathways whereby calcium-dependent processes can down-regulate GSK3 β activity is plausible. Here, we observed that NR2A-induced Tau dephosphorylation and Ser9 phosphorylation were completely reversed by pre-incubation of slices in the presence of Chelerythine chloride, suggesting that the ability of NMDA to reduce Tau phosphorylation likely depends on the activation of classical PKC and subsequent blockade of GSK3 β activity. Several PKC isoforms are expressed in the hippocampus (for review see [39]), and it remains to be established which enzyme might be more inclined to regulate phosphorylation levels of both Tau and GSK3 β after NR2A receptor stimulation. A putative biochemical model that

accounts for the influence of NR2A receptors and the PKC/GSK3 β pathway on Tau phosphorylation at Ser199-202 is illustrated in Figure 8.

Of course, additional pathways that could inactivate GSK3 β during NMDA receptor activation may exist. Recently, gamma-Aminobutyric acid type A (GABA_A) receptors were implicated in the regulation of Tau phosphorylation at Ser199-202 epitopes. In this particular case, increased Tau phosphorylation at these residues was evoked after GABA_A receptor activation by a mechanism requiring cdk5 and, consequently, reduced protein phosphatase 2A (PP2A) association with Tau [40]. However, our pharmacological experiments, described above, suggest that NMDA-induced reduction of Tau phosphorylation did not involve a cdk5/phosphatase pathway as well as other pathways recognized to limit GSK3 β activity, namely Akt/PKB and PI3K. Among other possibilities, it has recently been demonstrated that GSK3 β phosphorylation at its Ser389 residue by the highly-enriched enzyme p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) attenuates GSK3 β activity similarly to that implicating Ser9 phosphorylation [41]. Therefore, experiments will be required to precisely establish whether or not NMDA-induced reduction of Tau phosphorylation might be dependent on a pathway involving GSK3 β inhibition via the p38MAPK mechanism.

Tau proteins contain three (R3) or four (R4) tandem repeats of 31 or 32 amino acids at the carboxyl terminus, and 29 or 58 amino acid inserts near the amino terminus [4, 27]. Thus, full-length human cDNA clones have various sequences ranging from 352 to 441 amino acids in length. The adult human brain contains six Tau isoforms, with R3 variants being more abundant than R4 isoforms [17, 42-44]. In rodents, Tau proteins have essentially R4 inserts at their carboxyl terminus with molecular weights ranging from 45 to 65 kDa when run on SDS-PAGE [45]. The present results suggest that not all Tau isoforms are subjected to reduced phosphorylation during NR2A receptor activation, as shown by using an antibody directed against Ser199-202 epitopes. In fact, it is interesting that after NMDA treatments of rat hippocampal slices, reduction of Tau phosphorylation at Ser199-202 sites appears specific for the 56- and 62-kDa isoforms.

On the other hand, when compared to other GSK3 β -targeted epitopes, NMDA treatments did not seem to influence sites located in the proline-rich (Ser 262) and C-terminal (Ser 404) domains of Tau proteins.

The exact molecular mechanisms underlying epitope- and isoform-specific Tau regulation by NR2A-containing NMDA receptors and GSK3 β are not yet understood. One possible explanation of these selective effects could be the differential localisation of Tau proteins. Interestingly, it was demonstrated previously that the antibody directed against Ser199-202 epitopes (i.e. AT-8) is more inclined to interact with GSK3 β -targeted Tau proteins located in the somatodendritic compartment of neurons, whereas other antibodies, such as those directed against Ser404 and 396 epitopes, appear to react more strongly with Tau isoforms distributed within axonal pools [44]. In this respect, recent studies have demonstrated that the phosphorylation state of Tau directly impacts cellular localisation [27, 46]. According to Pooler et al. [47], reduced phosphorylation at Ser199-202 epitopes might rapidly favour translocation of Tau proteins to neuronal plasma membranes and, consequently, limit Tau accumulation in the cytoplasmic compartment where it may contribute to neurofibrillary pathology. Consequently, our selective results on Ser199-202 of Tau suggest that the NR2A/PKC/GSK3 β pathway could mainly interact with Tau proteins located in the somatodendritic compartment. On the other hand, the present studies examining the relationship between Tau phosphorylation and NMDA receptors indicate that NR2A subunits predominantly regulate Ser199-202 epitopes. Of course, the fact that NR2A-induced reduction in Tau phosphorylation was dominant as NMDA concentration increases suggests that NR2A receptors might be strategically located to initiate this downstream signalling. Mechanistically, it has also been reported that high NMDA concentrations can lead to activation of other signaling pathways, such as protein phosphatase-1, which has the potential to limit NR2B receptor activation, calcium overload and neurodegeneration during an excitotoxic event [5]. These possibilities should be evaluated further.

Summary and Conclusions

The current study supports our previous observations that NR2A-containing NMDA receptors are potentially important for controlling Tau phosphorylation in the hippocampus. In fact, the present findings argue that stimulation of these receptors might function as a molecular device limiting Tau phosphorylation in neuropathological conditions, a notion which appears to be consistent with overwhelming evidence that NR2A receptors are coupled to neuroprotective mechanisms likely to reduce cell death [25]. Thus, the fact that NR2A receptor activation is associated with reduction of Tau phosphorylation at Ser199-202 epitopes through GSK3 β inactivation strongly suggests that the effect reported here may have interesting implications from a therapeutic perspective. Several experiments have demonstrated that hyperphosphorylation is linked with dissociation of Tau from microtubules, accentuating (mis)localisation of Tau proteins in dendrites [46, 48-50]. Our results highlight the need to explore the possibility that NR2A-induced dephosphorylation could limit Tau (mis)localisation in dendrites in response to neuronal insults coupled with, for instance, amyloid-induced neuronal defects [48]. These and other findings might eventually provide critical guidance in the development of better treatments of tauopathies, some of which could be targeted at up-regulating NR2A-mediated reduction of GSK3 β activity by PKC isoforms. Consistent with this scenario is a recent study demonstrating that Tau dysfunction and neurofibrillary tangle formation are abolished by silencing GSK3 β activity in Alzheimer's disease transgenic mouse models [34], and many other observations indicate that PKC activators can exert antidementic effects during premature ageing of the brain [39, 51-54].

Of course, more detailed studies are required to address whether this NR2A-mediated reduction in GSK3 β activity could also be important for limiting the progression of other cellular damages (particularly liposomal dysfunctions) which are associated with Alzheimer's disease [55] and further studies are definitely necessary to elucidate whether the NR2A/PKC/GSK3 β pathway may provide novel perspectives for the treatment of excitotoxicity in pathologies such as ischemic stroke.

Acknowledgments

The present research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Michel Cyr (Grant 311763) and Guy Massicotte (Grant 105942). The authors thank Ovid Da Silva for editing this manuscript.

Figure Legends

Figure 1. Tau phosphorylation at Ser199-202 sites is reduced after NMDA treatment. Phosphorylation and protein levels were estimated by Western blotting of cell extracts (40 µg proteins) obtained from hippocampal slices treated with increasing concentrations of NMDA for 1 hour. Phosphorylated Tau levels at Ser199-202, expressed relative to total Tau (Tau-5) levels, were measured in slices treated with or without NMDA. The data were expressed as percentages of control values and are means±S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 8 different rats. For statistical analysis, one-way ANOVA was followed by Newman-Keul's *post hoc* test. *P<0.05, **P<0.01, NMDA-treated versus control.

Figure 2. NMDA-induced changes in Tau phosphorylation is isoform-specific. Phosphorylated Tau levels at Ser199-202 were estimated by Western blotting of cell extracts obtained from acute hippocampal slices treated with or without 10 µM NMDA for 1 hour. Four Tau isoforms were detected in blots developed with antibody directed against Ser199-202. Expressed relative to total Tau (i.e. Tau-5) levels, the data indicate that NMDA-induced reduction of Tau phosphorylation was striking for the 62-kDa isoform and, at a lesser degree, for the 56-kDa isoform. The data are expressed as percentages of control values and are means±S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 8 different rats. Since each isoform was investigated independently, statistical significance was determined by unpaired T-test. *P<0.05, **P<0.01, NMDA-treated versus respective control.

Figure 3. Tau phosphorylation at Ser262 and Ser404 residues is not altered by NMDA. Phosphorylation and protein levels were estimated by Western blotting of cell extracts (40 µg proteins) obtained from hippocampal slices treated with 10 µM NMDA for 1 hour. Phosphorylated Tau levels, expressed relative to total Tau (i.e. Tau-5) levels, were measured with antibodies raised against Tau phosphorylated at Ser199-202, Ser262 and Ser404. The data are expressed as percentages of control values and are means±S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 6 different rats. Since

these experiments were performed independently, we determined statistical significance by unpaired T-test. $**P<0.01$, NMDA-treated versus control.

Figure 4. NMDA-induced changes in Tau phosphorylation are NR2A receptor-dependent. Phosphorylated Tau levels at Ser199-202 were estimated by Western blotting of cell extracts obtained from hippocampal slices. In basal conditions, slices were exposed to an NMDA concentration ($1\text{ }\mu\text{M}$) which had no effect on Tau phosphorylation. In parallel experiments, NMDA-treated slices were pre-incubated with the NR2B receptor antagonist RO25-6981 ($1\text{ }\mu\text{M}$), the NR2A receptor antagonist NVP-AAM077 (50 nM) or with a mixture of NR2B and NR2A (RO25-6981; $1\text{ }\mu\text{M}$ and NVP-AAM077; 50 nM) receptor antagonists. Representative Western blots and quantitative data on each condition revealed that NMDA-induced reduction of Tau phosphorylation was exacerbated after blockade of NR2B receptors. On the contrary, Tau becomes hyperphosphorylated after blockade of NR2A receptors with NVP-AAM077 (50 nM). The data, expressed relative to total Tau (i.e. Tau-5) levels, are means \pm S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 8 different rats. For statistical analysis, one-way ANOVA was followed by Newman-Keul's *post hoc* test. $*P<0.05$, $**P<0.01$, drug-treated versus control.

Figure 5. NMDA-induced changes in Tau phosphorylation are mediated by calcium and GSK3 β . **a)** Phosphorylated Tau levels at Ser199-202 were estimated by Western blotting of cell extracts obtained from hippocampal slices treated with $10\text{ }\mu\text{M}$ NMDA for 1 hour alone or in combination with $10\text{ }\mu\text{M}$ BAPTA. The data are expressed relative to total Tau (i.e. Tau-5) levels. **b)** Phosphorylated GSK3 β levels at Ser9 and Tyr216 epitopes were estimated by Western blotting of cell extracts obtained from hippocampal slices treated with $5\text{ }\mu\text{M}$ NMDA for 1 hour. The data are expressed relative to total GSK3 β levels as percentages of control values and are means \pm S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 9 different rats. For statistical analysis, one-way ANOVA was followed by Newman-Keul's *post hoc* test. $**P<0.01$, $***P<0.001$, drug-treated versus control.

Figure 6. NMDA-induced changes in Tau phosphorylation require PKC activation.

a) Phosphorylated Tau levels at Ser199-202 were estimated by Western blotting of cell extracts obtained from hippocampal slices treated with 10 μ M NMDA for 1 hour alone or in combination with the Akt/PKB inhibitor 10-DEBC hydrochloride (10-DEBC; 2.5 μ M) and the PI3K inhibitor LY294002 (10 μ M). The data are expressed relative to total Tau (i.e. Tau-5) levels. **b)** As in A, except that the cdk5 inhibitor Roscovitine (Rosco; 10 μ M) and the global PKC inhibitor Chelerythrine chloride (Chele; 1 μ M) were employed. The data are expressed as percentages of control values and are means \pm S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 6 different rats. For statistical analysis, one-way ANOVA was followed by Newman-Keul's *post hoc* test. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, drug-treated versus control.

Figure 7. NMDA-induced changes in GSK3 β Ser9 phosphorylation are mediated by PKC activation.

Phosphorylated GSK3 β levels at Ser9 and Tyr216 epitopes were estimated by Western blotting of cell extracts obtained from hippocampal slices treated with 5 μ M NMDA for 1 hour alone or in combination with the PKC inhibitor Chelerythrine chloride (Chele; 1 μ M). The data are expressed relative to total GSK3 β levels and as percentages of control values. They are the means \pm S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 7 different rats. For statistical analysis, one-way ANOVA was followed by Neuman-Keul's *post hoc* test. ***P<0.001, drug-treated versus control.

Figure 8. Working model of NMDA-induced reduction of Tau phosphorylation.

Activation of NR2A-containing receptors appears to initiate Tau phosphorylation through a mechanism involving calcium accumulation and, consequently, GSK3 β inactivation via Ser9 phosphorylation by PKC. Through an unknown mechanism, the PKC/GSK3 β pathway could selectively reduce the phosphorylation of Ser199-202 residues in the proline-rich domain of Tau. Physiologically, activation of NR2A-containing receptors may reduce Tau phosphorylation which could have an impact on protein localisation and aggregation in neurons. The possibility of a positive feedback loop between PKC activation and stimulation of NMDA receptors cannot be excluded

[56]. Accordingly, Jones et al. [57] recently demonstrated that activation of the atypical isoform PKC zeta (PKC ζ) is selectively couples with potentiation of NR2A-containing NMDA receptors.

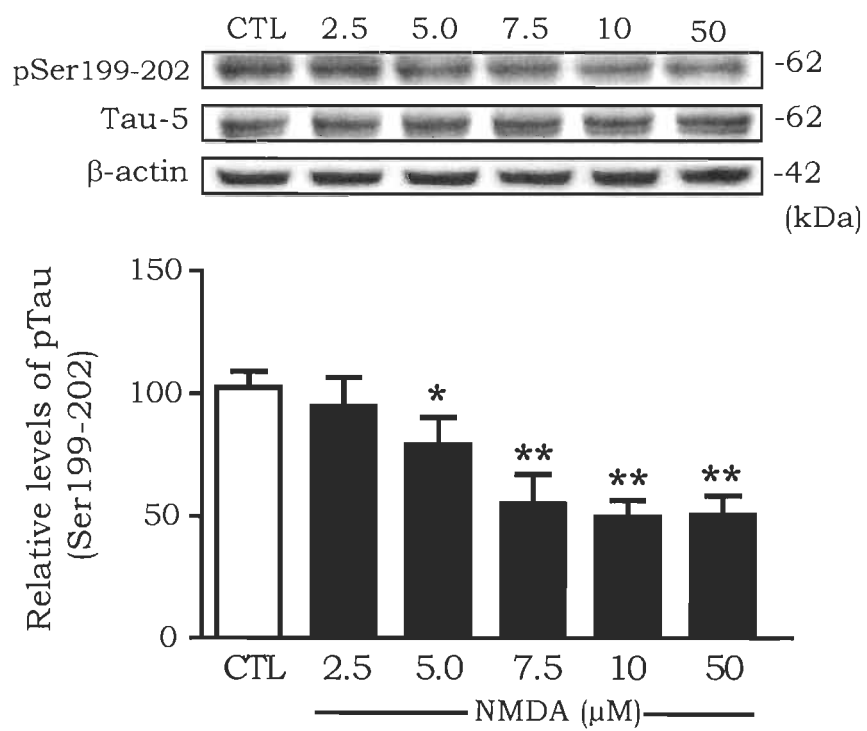


Figure 1 (De Montigny et. al.)

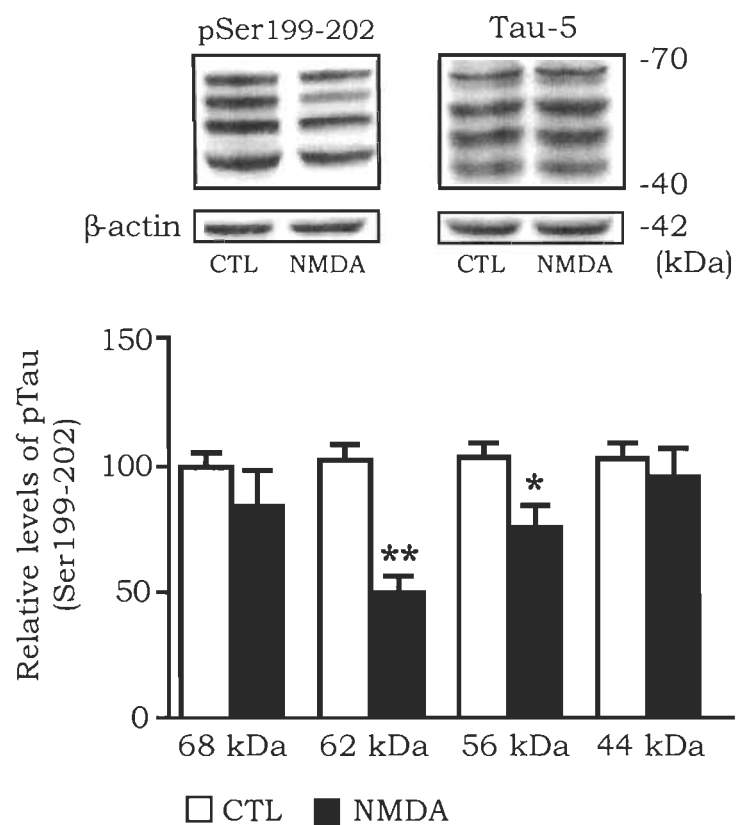


Figure 2 (De Montigny et. al.)

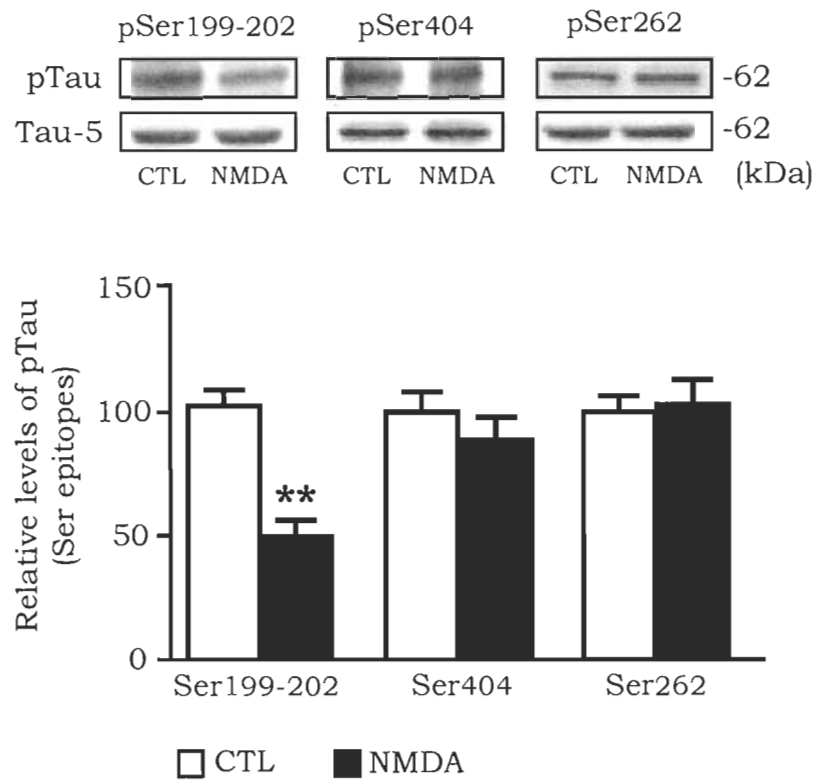


Figure 3 (De Montigny et. al.)

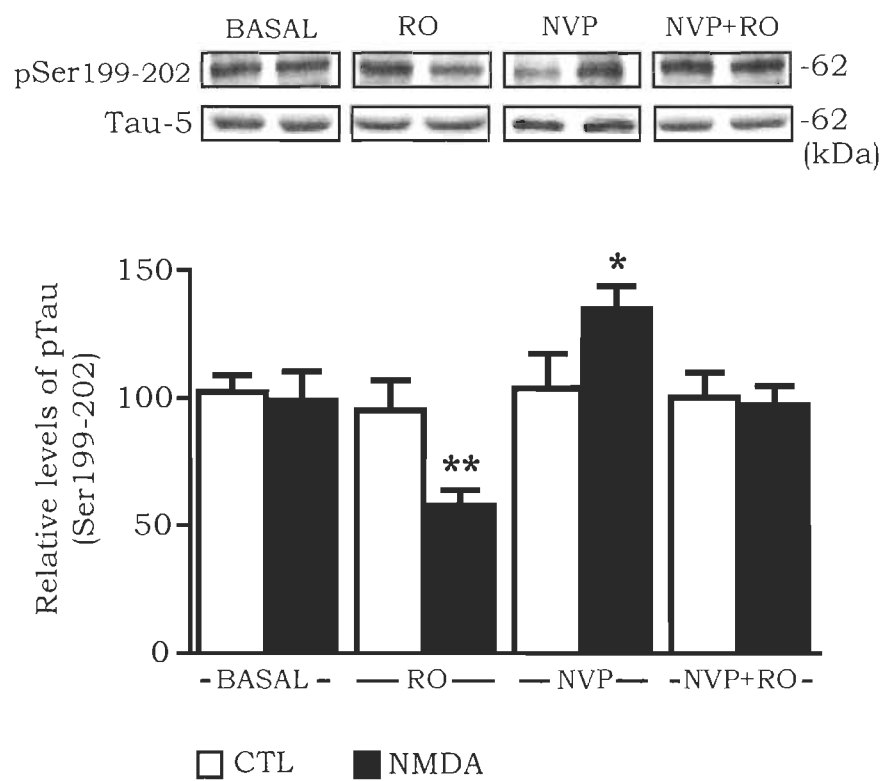


Figure 4 (De Montigny et. al.)

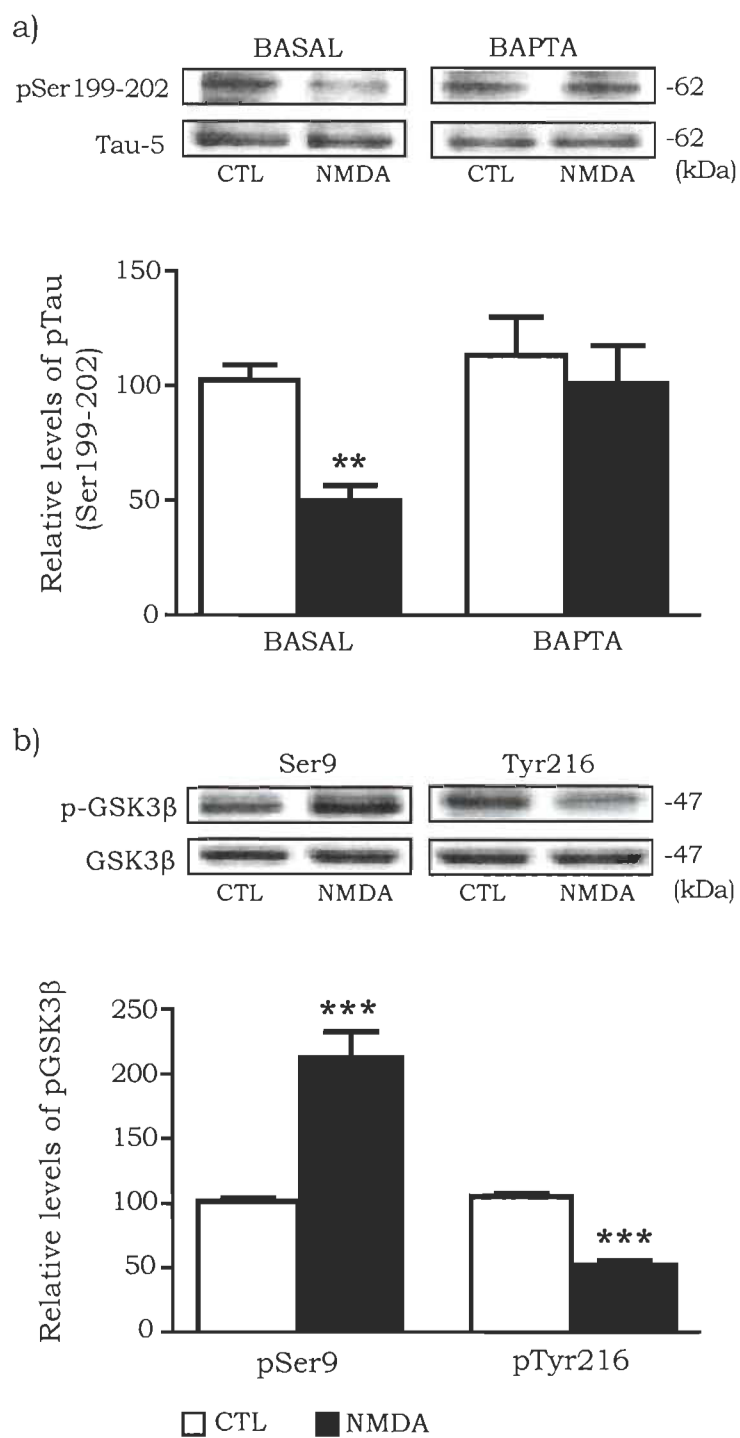


Figure 5 (De Montigny et. al.)

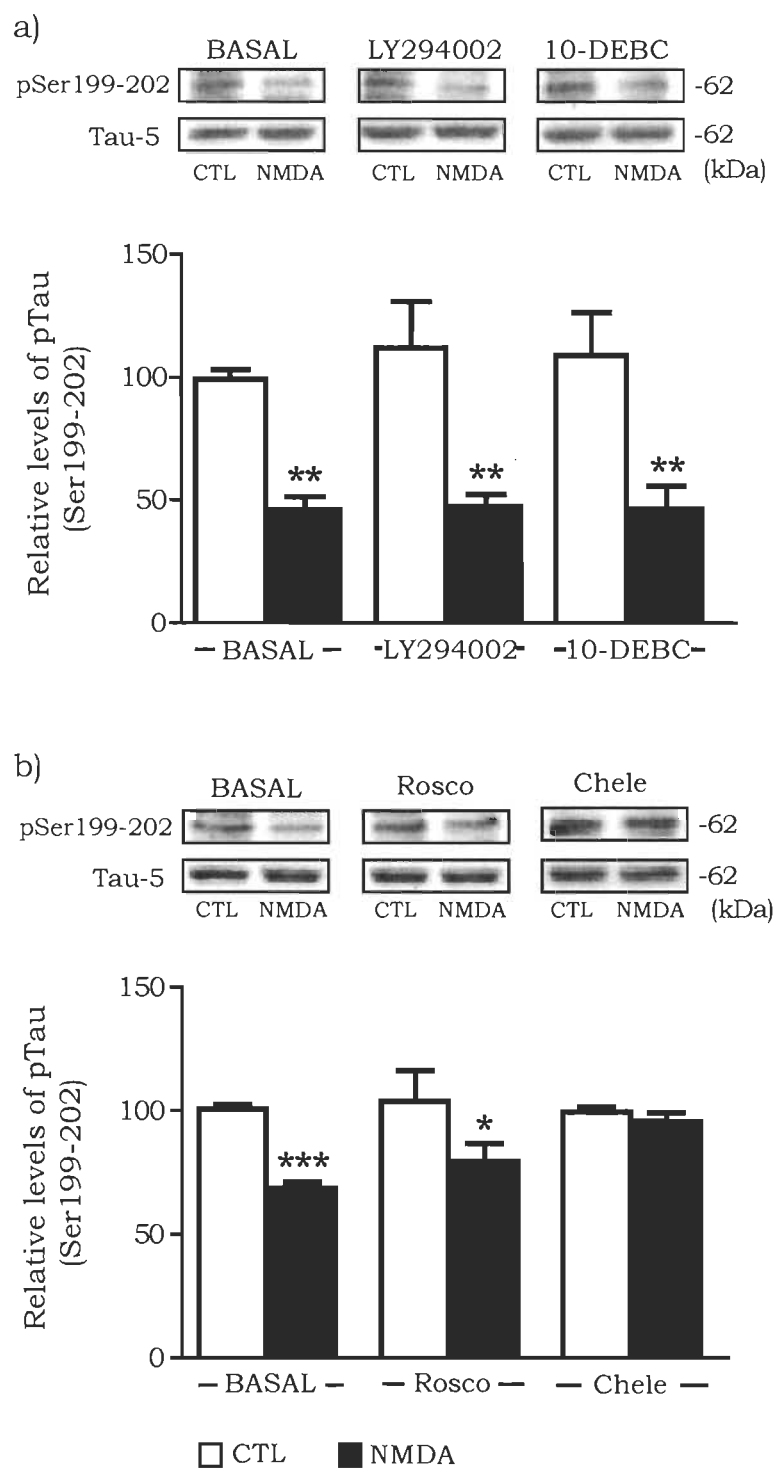


Figure 6 (De Montigny et. al.)

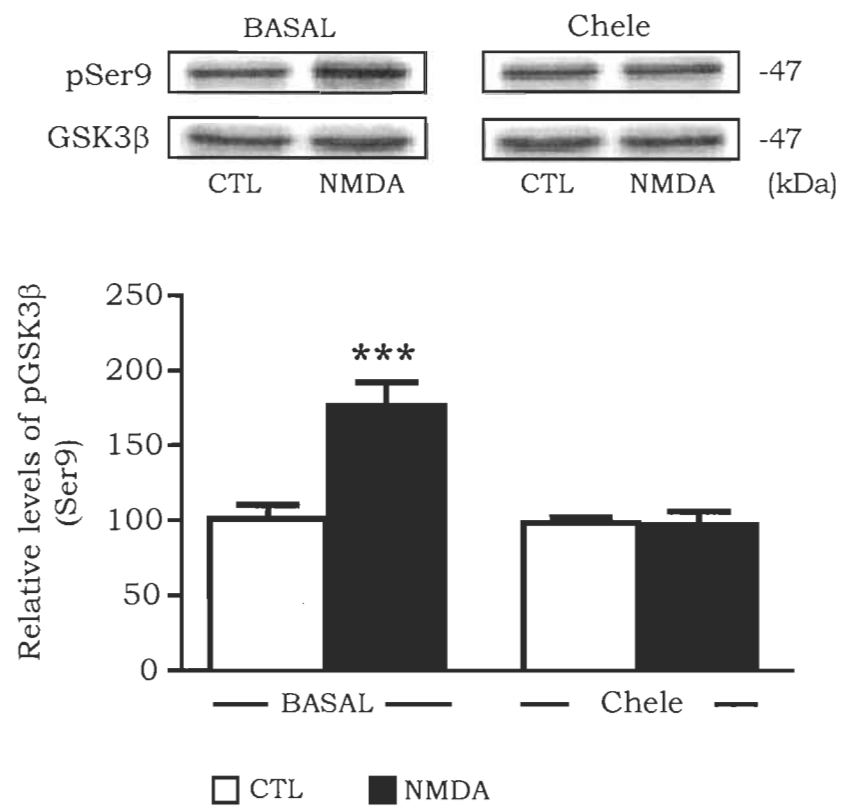


Figure 7 (De Montigny et. al.)

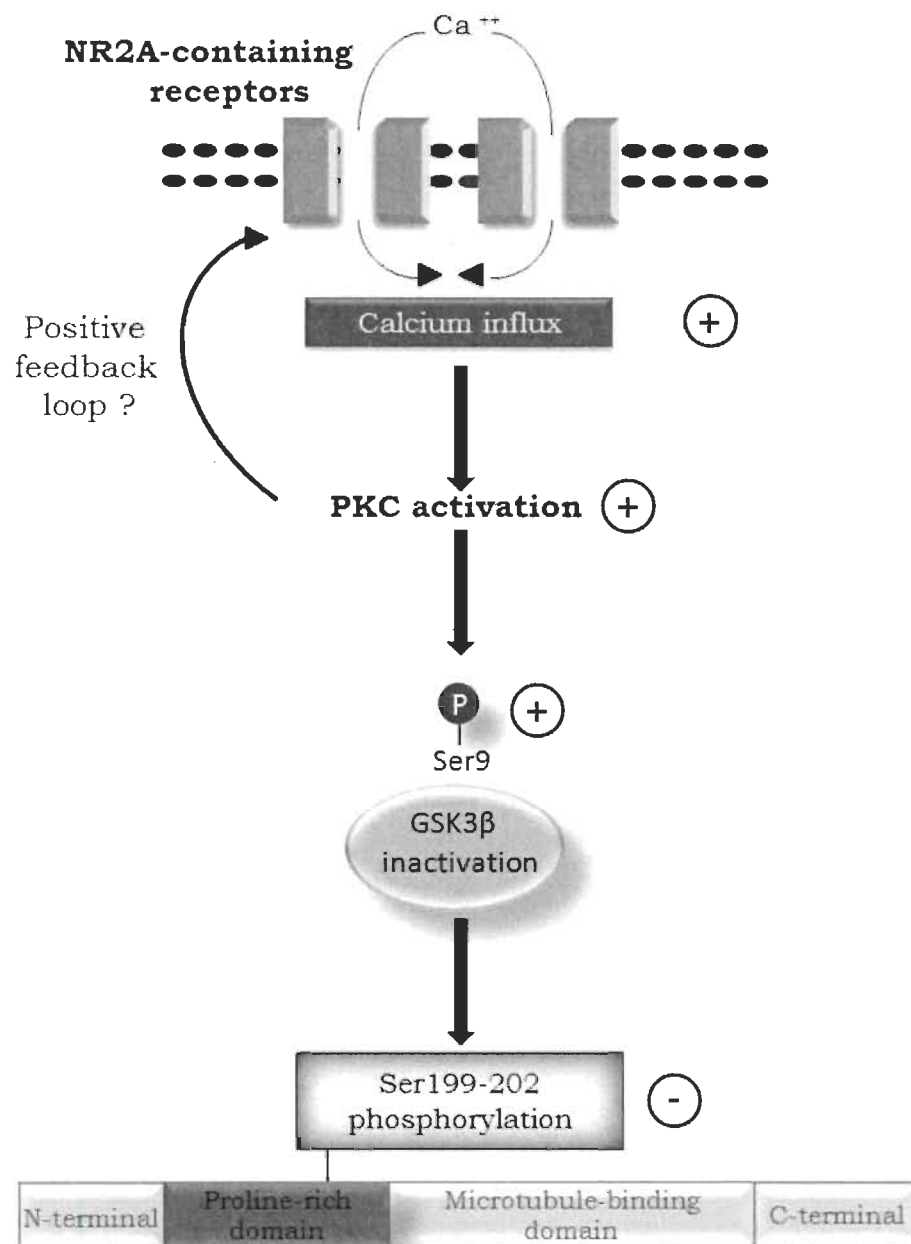


Figure 8 (De Montigny et al.)

Références

- [1] S. Papadia and G. E. Hardingham, "The dichotomy of NMDA receptor signaling", *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, Vol. 13, pp. 572-579, 2007.
- [2] G. E. Hardingham and H. Bading, "The Yin and Yang of NMDA receptor signalling", *Trends in neurosciences*, Vol. 26, pp. 81-89, 2003.
- [3] M. Hetman and G. Kharebava, "Survival signaling pathways activated by NMDA receptors", *Current topics in medicinal chemistry*, Vol. 6, pp. 787-799, 2006.
- [4] C. Ikonomidou, F. Bosch, M. Miksa, et al., "Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain", *Science*, Vol. 283, pp. 70-74, 1999.
- [5] M. Farinelli, F. D. Heitz, B. F. Grewe, et al., "Selective regulation of NR2B by protein phosphatase-1 for the control of the NMDA receptor in neuroprotection", *PloS one*, Vol. 7, pp. e34047, 2012.
- [6] A. J. Scheetz, A. C. Nairn and M. Constantine-Paton, "NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses", *Nature neuroscience*, Vol. 3, pp. 211-216, 2000.
- [7] M. A. Sutton, H. T. Ito, P. Cressy, et al., "Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis", *Cell*, Vol. 125, pp. 785-799, 2006.
- [8] C. C. Wang, R. G. Held, S. C. Chang, et al., "A critical role for GluN2B-containing NMDA receptors in cortical development and function", *Neuron*, Vol. 72, pp. 789-805, 2011.
- [9] H. Fiumelli, I. M. Riederer, J. L. Martin, et al., "Phosphorylation of neurofilament subunit NF-M is regulated by activation of NMDA receptors and modulates cytoskeleton stability and neuronal shape", *Cell motility and the cytoskeleton*, Vol. 65, pp. 495-504, 2008.
- [10] D. H. Baird, E. Trenkner and C. A. Mason, "Arrest of afferent axon extension by target neurons in vitro is regulated by the NMDA receptor", *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 16, pp. 2642-2648, 1996.

- [11] E. M. Quinlan and S. Halpain, "Postsynaptic mechanisms for bidirectional control of MAP2 phosphorylation by glutamate receptors", *Neuron*, Vol. 16, pp. 357-368, 1996.
- [12] M. Llansola, R. Saez and V. Felipo, "NMDA-induced phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP-2 is mediated by activation of nitric oxide synthase and MAP kinase", *The European journal of neuroscience*, Vol. 13, pp. 1283-1291, 2001.
- [13] L. M. Fleming and G. V. Johnson, "Modulation of the phosphorylation state of tau in situ: the roles of calcium and cyclic AMP", *The Biochemical journal*, Vol. 309 (Pt 1), pp. 41-47, 1995.
- [14] J. Z. Wang and F. Liu, "Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons", *Progress in neurobiology*, Vol. 85, pp. 148-175, 2008.
- [15] E. M. Mandelkow and E. Mandelkow, "Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration", *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, Vol. 2, pp. a006247, 2012.
- [16] M. Morris, S. Maeda, K. Vossel, et al., "The many faces of tau", *Neuron*, Vol. 70, pp. 410-426, 2011.
- [17] T. F. Gendron and L. Petrucelli, "The role of tau in neurodegeneration", *Molecular neurodegeneration*, Vol. 4, pp. 13, 2009.
- [18] G. Kohr, "NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution", *Cell and tissue research*, Vol. 326, pp. 439-446, 2006.
- [19] S. Berberich, V. Jensen, O. Hvalby, et al., "The role of NMDAR subtypes and charge transfer during hippocampal LTP induction", *Neuropharmacology*, Vol. 52, pp. 77-86, 2007.
- [20] A. Wenzel, J. M. Fritschy, H. Mohler, et al., "NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins", *Journal of neurochemistry*, Vol. 68, pp. 469-478, 1997.
- [21] A. Sanz-Clemente, R. A. Nicoll and K. W. Roche, "Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences", *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, Vol. 19, pp. 62-75, 2013.

- [22] S. Cull-Candy, S. Brickley and M. Farrant, "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease", *Current opinion in neurobiology*, Vol. 11, pp. 327-335, 2001.
- [23] Z. Liu, C. Lv, W. Zhao, et al., "NR2B-containing NMDA receptors expression and their relationship to apoptosis in hippocampus of Alzheimer's disease-like rats", *Neurochemical research*, Vol. 37, pp. 1420-1427, 2012.
- [24] Y. Liu, T. P. Wong, M. Aarts, et al., "NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo", *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 27, pp. 2846-2857, 2007.
- [25] A. M. Choo, D. M. Geddes-Klein, A. Hockenberry, et al., "NR2A and NR2B subunits differentially mediate MAP kinase signaling and mitochondrial morphology following excitotoxic insult", *Neurochemistry international*, Vol. 60, pp. 506-516, 2012.
- [26] J. Allyson, E. Dontigny, Y. Auberson, et al., "Blockade of NR2A-containing NMDA receptors induces Tau phosphorylation in rat hippocampal slices", *Neural plasticity*, Vol. 2010, pp. 340168, 2010.
- [27] L. Buee, T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, et al., "Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders", *Brain research. Brain research reviews*, Vol. 33, pp. 95-130, 2000.
- [28] C. A. Maurage, N. Sergeant, M. M. Ruchoux, et al., "Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology", *Acta neuropathologica*, Vol. 105, pp. 89-97, 2003.
- [29] J. Avila, J. J. Lucas, M. Perez, et al., "Role of tau protein in both physiological and pathological conditions", *Physiological reviews*, Vol. 84, pp. 361-384, 2004.
- [30] E. A. Waxman and D. R. Lynch, "N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease", *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, Vol. 11, pp. 37-49, 2005.
- [31] J. T. Yu, R. C. Chang and L. Tan, "Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapeutic opportunities", *Progress in neurobiology*, Vol. 89, pp. 240-255, 2009.

- [32] A. A. George, G. T. Macleod and H. H. Zakon, "Calcium-dependent phosphorylation regulates neuronal stability and plasticity in a highly precise pacemaker nucleus", *Journal of neurophysiology*, Vol. 106, pp. 319-331, 2011.
- [33] Y. Kambe, N. Nakamichi, T. Takarada, et al., "A possible pivotal role of mitochondrial free calcium in neurotoxicity mediated by N-methyl-d-aspartate receptors in cultured rat hippocampal neurons", *Neurochemistry international*, Vol. 59, pp. 10-20, 2011.
- [34] D. E. Hurtado, L. Molina-Porcel, J. C. Carroll, et al., "Selectively silencing GSK-3 isoforms reduces plaques and tangles in mouse models of Alzheimer's disease", *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 32, pp. 7392-7402, 2012.
- [35] F. Plattner, M. Angelo and K. P. Giese, "The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 281, pp. 25457-25465, 2006.
- [36] C. A. Bradley, S. Peineau, C. Taghibiglou, et al., "A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity", *Frontiers in molecular neuroscience*, Vol. 5, pp. 13, 2012.
- [37] B. Song, B. Lai, Z. Zheng, et al., "Inhibitory phosphorylation of GSK-3 by CaMKII couples depolarization to neuronal survival", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 285, pp. 41122-41134, 2010.
- [38] F. Ortega, R. Perez-Sen, V. Morente, et al., "P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons", *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, Vol. 67, pp. 1723-1733, 2010.
- [39] M. K. Sun and D. L. Alkon, "Activation of protein kinase C isozymes for the treatment of dementias", *Advances in Pharmacology*, Vol. 64, pp. 273-302, 2012.
- [40] N. P. Nykanen, K. Kysenius, P. Sakha, et al., "gamma-Aminobutyric acid type A (GABAA) receptor activation modulates tau phosphorylation", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 287, pp. 6743-6752, 2012.
- [41] T. M. Thornton, G. Pedraza-Alva, B. Deng, et al., "Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation", *Science*, Vol. 320, pp. 667-670, 2008.

- [42] T. Bullmann, R. de Silva, M. Holzer, et al., "Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus", *Hippocampus*, Vol. 17, pp. 98-102, 2007.
- [43] V. M. Lee, K. R. Brunden, M. Hutton, et al., "Developing therapeutic approaches to tau, selected kinases, and related neuronal protein targets", *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, Vol. 1, pp. a006437, 2011.
- [44] K. Voss and T. C. Gamblin, "GSK-3 β phosphorylation of functionally distinct tau isoforms has differential, but mild effects", *Molecular neurodegeneration*, Vol. 4, pp. 18, 2009.
- [45] M. G. Spillantini and M. Goedert, "Tau protein pathology in neurodegenerative diseases", *Trends in neurosciences*, Vol. 21, pp. 428-433, 1998.
- [46] S. Mondragon-Rodriguez, E. Trillaud-Doppia, A. Dudilot, et al., "Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 287, pp. 32040-32053, 2012.
- [47] A. M. Pooler, A. Usardi, C. J. Evans, et al., "Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation", *Neurobiology of aging*, Vol. 33, pp. 431 e427-438, 2012.
- [48] L. M. Ittner, Y. D. Ke, F. Delerue, et al., "Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models", *Cell*, Vol. 142, pp. 387-397, 2010.
- [49] H. Zempel, E. Thies, E. Mandelkow, et al., "A β oligomers cause localized Ca²⁺ elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines", *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 30, pp. 11938-11950, 2010.
- [50] B. R. Hoover, M. N. Reed, J. Su, et al., "Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration", *Neuron*, Vol. 68, pp. 1067-1081, 2010.
- [51] M. K. Sun and D. L. Alkon, "Pharmacology of protein kinase C activators: cognition-enhancing and antidementic therapeutics", *Pharmacology & therapeutics*, Vol. 127, pp. 66-77, 2010.

- [52] D. L. Alkon, M. K. Sun and T. J. Nelson, "PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease", *Trends in pharmacological sciences*, Vol. 28, pp. 51-60, 2007.
- [53] J. de Barry, C. M. Liegeois and A. Janoshazi, "Protein kinase C as a peripheral biomarker for Alzheimer's disease", *Experimental gerontology*, Vol. 45, pp. 64-69, 2010.
- [54] T. K. Khan, T. J. Nelson, V. A. Verma, et al., "A cellular model of Alzheimer's disease therapeutic efficacy: PKC activation reverses Abeta-induced biomarker abnormality on cultured fibroblasts", *Neurobiology of disease*, Vol. 34, pp. 332-339, 2009.
- [55] X. Bi, "Alzheimer disease: update on basic mechanisms", *The Journal of the American Osteopathic Association*, Vol. 110, pp. S3-9, 2010.
- [56] J. Y. Lan, V. A. Skeberdis, T. Jover, et al., "Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating", *Nature neuroscience*, Vol. 4, pp. 382-390, 2001.
- [57] M. L. Jones, G. Y. Liao, R. Malecki, et al., "PI 3-kinase and PKC ζ mediate insulin-induced potentiation of NMDA receptor currents in *Xenopus* oocytes", *Brain research*, Vol. 1432, pp. 7-14, 2012.

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE

On a longtemps considéré les récepteurs NMDA comme un des acteurs clés de l'hyperphosphorylation de Tau dans diverses affections neuropathologiques. Or, la présente étude apporte un regard nouveau sur cette hypothèse. En analysant de près la protéine Tau de l'hippocampe, il ressort que l'activation des récepteurs NMDA fait en sorte de diminuer la phosphorylation de Tau, et ce, par une cascade d'événements impliquant d'abord l'activation des récepteurs synaptiques de type NR1/NR2A, l'entrée neuronale de calcium et l'activation de la PKC qui ultimement favorise la phosphorylation de GSK3 β à son site Ser9. De telle sorte que cela préviendrait la phosphorylation de Tau à ses sites Ser199-202. Quant à l'activité des récepteurs extrasynaptiques NR1/NR2B, ils seraient eux susceptibles d'accentuer l'hyperphosphorylation de Tau, mais uniquement lors d'un déficit en récepteurs synaptiques. La discussion qui suit présente les principales observations recueillies dans le rôle des récepteurs NMDA sur la modulation de la phosphorylation de la protéine Tau, ainsi que la signalisation qui en découle. En conclusion, nous mettrons l'accent sur l'importance que représente cette étude quant à l'élaboration de nouvelles cibles thérapeutiques pour les maladies neurodégénératives.

5.1 La protéine Tau : effets sur sa phosphorylation et sa localisation

Quelques études avaient déjà démontré que l'activation des récepteurs NMDA pouvait réduire le niveau de phosphorylation de certaines protéines du cytosquelette, sans toutefois en préciser sur les sous-unités impliquées ou encore la signalisation (Fleming et Johnson, 1995; Quinlan et Halpain, 1996; Adamec *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 1997). Par contre, une étude réalisée par Montoro et son équipe indique que l'application de NMDA entraîne une hypophosphorylation de la protéine MAP2, sur des

tranches d'hippocampes de rats, qui serait associée à l'activation de la phosphatase dépendante du calcium et de la calmoduline, la calcineurine, aussi nommée PP2B (Montoro *et al.*, 1993). Les résultats de notre étude montrent une déphosphorylation sur la protéine Tau, mais qui impliquerait plutôt les kinases PKC et GSK3 β . De plus, cette diminution serait liée à l'activation préférentielle des résidus NR1/NR2A et serait propre à certains sites de phosphorylation, ainsi qu'à certains isoformes de la protéine.

La famille des protéines Tau comprend six isoformes obtenues par l'épissage alternatif (Buee *et al.*, 2000). Chaque isoforme a la possibilité d'avoir une, deux ou aucune insertion dans la région N-terminale, soit l'exon 2 et l'exon 3, ce qui ajoute 29 ou 58 acides aminés à la séquence. L'exon 3 n'est jamais présent sans l'exon 2, alors lorsqu'il n'y a qu'une seule insertion amino-terminale, il s'agit de l'exon 2. De plus, la région C-terminal peut avoir trois ou quatre répétitions d'une certaine séquence (3R ou 4R). L'ajout de cette quatrième répétition est dû à la présence ou l'absence de l'exon 10. L'épissage alternatif produit alors six isoformes de différentes longueurs de séquence et ainsi de poids moléculaires variés (0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R et 2N4R). L'isoforme la plus petite, dû à l'absence des trois exons possibles, est la seule protéine Tau présente dans le développement fœtal (Buee *et al.*, 2000; Bullmann *et al.*, 2007). À l'âge adulte, les six différentes protéines Tau seront présentes, mais le niveau d'expression n'est pas fait également dans les différentes populations neuronales. Au cours des premières étapes du développement, ce sont les isoformes 3R qui sont les plus exprimées, mais à l'âge adulte l'expression des isoformes 3R est égale à celle des 4R. (Ke *et al.*, 2012; Llorens-Martin *et al.*, 2012). Un changement dans ce ratio 3R/4R pourrait d'ailleurs être impliqué dans certaines maladies neurodégénératives, comme la démence de type Alzheimer (Ke *et al.*, 2012).

Dans le cadre de nos recherches, nous avons détecté, par immunobuvardage de type « western blot », quatre différentes isoformes de Tau à des poids moléculaires allant de 44 à 68 kDa. Chez les rongeurs, il y a seulement les isoformes 4R, ainsi que la plus petite séquence au niveau fœtal, ce qui explique l'apparition de seulement quatre isoformes dans nos expériences (Spillantini et Goedert, 1998; Takuma *et al.*,

2003; Bullmann *et al.*, 2007). L'analyse des différentes bandes obtenues montre que la phosphorylation de la protéine Tau varie selon l'isoforme. L'ajout de NMDA a entraîné une diminution importante sur l'isoforme à 62 kDa et une plus légère à 56 kDa, alors que les isoformes de 44 et 68 kDa ne sont pas modifiées. L'isoforme à approximativement 62 kDa, ayant une insertion amino-terminale et les quatre répétitions C-terminal (1N4R), est d'ailleurs la plus exprimée chez le rat et plusieurs autres rongeurs. Cette insertion aurait probablement une fonction plus importante dans la cellule (Takuma *et al.*, 2003). Le poids moléculaire lors des expériences a été estimé à l'aide du marqueur moléculaire utilisé. Il peut y avoir des variations du poids des isoformes avec la littérature, puisque le niveau de phosphorylation influence celui-ci (Buee *et al.*, 2000). Donc, il ressort de nos résultats que la déphosphorylation de la protéine Tau résultant de l'activité des récepteurs NMDA varie selon les isoformes de la protéine, en modulant principalement la protéine de 62 kDa.

Nos résultats montrent aussi que les différents sites de phosphorylation sur la protéine Tau ne sont pas influencés de la même façon par l'activation des récepteurs NMDA. Effectivement, nous avons observé une déphosphorylation aux sites Ser199-202, un site de la région riche en proline, mais aucune modification au niveau d'un site de phosphorylation du domaine de fixation des microtubules (Ser262) et d'un de la région C-terminal (Ser404). Ces résultats correspondent avec la littérature qui considère les sites Ser199-202 comme étant particulièrement importants dans la régulation des fonctions de la protéine Tau, mais aussi dans l'apparition des agrégats pathologiques. De fait, il semble que lors de l'hyperphosphorylation de la protéine dans les maladies neurodégénératives, les sites Ser199-202 soient atteints bien avant les sites C-terminal comme Ser404 (Maurage *et al.*, 2003; Luna-Munoz *et al.*, 2007). Toutefois, comme la protéine Tau compte plus de 80 sites de phosphorylation possibles, il se peut que d'autres sites, que nous n'avons pas observés, soient modulés par l'activation des récepteurs. Aussi, la réalisation des expériences s'est fait à certaines concentrations et à un temps donné. L'utilisation du NMDA à forte concentration ou à un temps d'incubation plus long pourrait influencer différemment les sites de phosphorylation. Il

découle de nos résultats que la déphosphorylation observée sur la protéine Tau lors de l'activation des récepteurs NMDA est épitope spécifique aux sites Ser199-202.

De nombreux travaux mettent actuellement en relief les rôles divers associés au changement de localisation de la protéine Tau. En effet, celle-ci pourrait se retrouver à plusieurs endroits dans le neurone selon son état de phosphorylation. Des études ont démontré que la protéine Tau pouvait se lier à une protéine kinase de la famille des Src kinase, nommée Fyn. Le complexe Tau-Fyn peut ensuite être transporté jusqu'à la membrane (Buee *et al.*, 2000; Haass et Mandelkow, 2010). Pour assurer la liaison entre la protéine Tau et Fyn, Tau doit être dans un état de déphosphorylation. En effet, l'état d'hyperphosphorylation de la protéine mène à une diminution de Fyn soluble et est associé à un niveau de sévérité de la maladie d'Alzheimer (Pooler *et al.*, 2012). Fyn aurait pour fonction de réguler le transport des protéines intracellulaires comme le déplacement de la protéine Tau dans divers compartiments et serait particulièrement importante dans la croissance neuronale. La liaison entre ces protéines serait cruciale pour la signalisation intracellulaire accomplie par Tau et aurait d'ailleurs un rôle de régulation dans la signalisation des récepteurs NMDA lorsque le complexe Tau-Fyn serait dans la région dendritique (Ittner *et al.*, 2010; Boehm, 2013). De fait, dans cette région, la protéine Fyn pourrait moduler la phosphorylation au niveau des récepteurs membranaires de type NR2B et ainsi favoriser le processus d'excitotoxicité (Ittner *et al.*, 2010; Trepanier *et al.*, 2012; Boehm, 2013).

Plusieurs études démontrent que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau mène à une accumulation de celle-ci au niveau somatodendritique et entraîne des dommages sévères pour la perte de synapses (Hoover *et al.*, 2010). Cette accumulation anormale pourrait même être liée à la toxicité induite par la β -amyloïde, une autre caractéristique histopathologique de plusieurs maladies, dont la maladie d'Alzheimer (Ittner *et al.*, 2010). Une étude réalisée par Sultan et son équipe est portée sur la localisation de Tau, mais cette fois-ci au niveau du noyau. Peu de chercheurs se sont intéressés au rôle que pourrait avoir Tau au niveau du noyau qui, pourtant, pourrait s'avérer crucial pour la survie cellulaire. Pour s'y prendre, ils ont provoqué un état de stress pour la cellule à

l'aide d'un traitement à la chaleur. Dans ces conditions, ils ont observé que la protéine Tau devient déphosphorylée à plusieurs sites, dont Ser199-202. Cet état permet à la protéine Tau d'être transportée jusqu'au noyau afin d'aller protéger l'ADN contre, par exemple, les radicaux libres du stress oxydatif. (Sultan *et al.*, 2011). À l'égard de ces observations, on ne peut exclure la possibilité que la protéine Tau se soit déplacée dans les neurones à la suite de l'activation des récepteurs NMDA dans nos traitements expérimentaux. Évidemment, il serait souhaitable de réaliser de nouvelles expériences, par exemple une technique d'immunofluorescence, afin de vérifier la localisation de la protéine.

Rappelons brièvement que les premières expériences accomplies montrent une diminution de la phosphorylation de Tau spécifiquement sur les sites Ser199-202 et qui affecterait principalement l'isoforme de 62 kDa. En explorant l'influence des antagonistes des récepteurs NMDA dans l'hippocampe de rats, nous avons observé que l'activation des récepteurs synaptiques, formés majoritairement par les sous-unités protéiniques NR1/NR2A, induit une baisse de phosphorylation de la protéine Tau. À l'opposé, l'activation des récepteurs extrasynaptiques, c.-à-d. NR1/NR2B, entraîne une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau. Les résultats sous-entendent des différences dans la signalisation entre les récepteurs NMDA ce qui concorde avec la littérature qui prétend que les récepteurs NR2B auraient des rôles dans l'excitotoxicité, à l'inverse de la neuroprotection des récepteurs NR2A (Liu *et al.*, 2007; Papadia et Hardingham, 2007; Hardingham et Bading, 2010). La suite du projet de maîtrise a été consacrée à la cascade de signalisation qui découle de l'activation des récepteurs NMDA et qui sera discutée dans la section suivante.

5.2 La signalisation induite par l'activation des récepteurs NMDA

La GSK-3 β a déjà été présentée dans ce manuscrit comme étant une kinase particulièrement importante tant dans la signalisation suivant l'activation des récepteurs NMDA (Bradley *et al.*, 2012) que sur la modulation de la phosphorylation de la protéine Tau (Voss et Gamblin, 2009). Il ressort de plusieurs études que la suractivation de

GSK3 β favorise l'hyperphosphorylation de la protéine Tau ce qui produit des effets nocifs (Lucas *et al.*, 2001; Hernandez *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2013b). De fait, la phosphorylation de la protéine Tau par GSK3 β provoque la déstabilisation des microtubules, affecte le rôle de Tau pour l'assemblage des microtubules et ainsi entraîne un dysfonctionnement du transport axonal (Utton *et al.*, 1997; Takashima, 2006; Avila *et al.*, 2012). Dans cette perspective, des chercheurs ont réalisé des expériences afin de diminuer l'activité de GSK3 β et ont démontré une baisse de la phosphorylation de la protéine Tau (Serenio *et al.*, 2009; Hurtado *et al.*, 2012). Il apparaît nécessaire de réduire l'activité de GSK3 β afin d'éviter certains effets toxiques pour les neurones (Hashimoto *et al.*, 2002; Avila *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2013b).

Afin de savoir le niveau d'activité de GSK3 β dans nos expériences, la phosphorylation de cette kinase a été observée par immunobuvardage de type « western blot ». Comme mentionné auparavant, plusieurs sites de phosphorylation sont présents afin de réguler son activité, particulièrement la Ser9 et la Tyr216. Les résultats obtenus montrent une augmentation de la Ser9 et une diminution de la Tyr216 ce qui suggère une diminution de l'activité de GSK3 β lors de l'activation des récepteurs NR2A. Ces données corrélaient bien avec la littérature et avec la baisse de phosphorylation aux sites Ser199-202 que nous avons observée.

Plusieurs kinases et phosphatases sont connues à ce jour comme étant capable de moduler la phosphorylation de la protéine Tau, mais aussi celle de GSK3 β , comme la cdk5, Akt/PKB et PP1 (Bradley *et al.*, 2012). Nombreuses sont les études qui identifient la cdk5 comme une kinase impliquée dans l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et de la formation des agrégats (Noble *et al.*, 2003; Piedrahita *et al.*, 2010; Shukla *et al.*, 2012). Une recherche récente montre que les récepteurs GABA_A sont impliqués dans la phosphorylation de Tau aux sites Ser199-202. De fait, ils ont identifié que l'activation des récepteurs GABA_A entraînerait une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau par l'action de la cdk5 et d'une baisse d'activité de la PP2A (Nykanen *et al.*, 2012). D'autres suggèrent l'interaction possible entre la cdk5 et GSK3 β . En effet, une hausse d'activité de cdk5 pourrait entraîner la phosphorylation de la Ser9 et ainsi

diminuer l'activité de GSK3 β (Plattner *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2008; Louis *et al.*, 2011). Cependant, comme il existe une panoplie de kinases et de phosphatases possible, les choix ont été limités aux kinases cdk5, Akt/PKB, PI3K et PKC, celles-ci sont reconnues pour limiter l'activité de GSK3 β et elles sont impliquées dans la modulation de la phosphorylation de la protéine Tau. Les résultats obtenus dans nos expériences suggèrent que la déphosphorylation de Tau à la suite de l'activation des récepteurs NMDA n'est pas due à l'activité de la cdk5, ni à la voie Akt/PI3K. En effet, cette dernière voie de signalisation est identifiée dans plusieurs études comme ayant un rôle important dans la régulation de GSK3 β et même dans la phosphorylation de Tau (Bradley *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012). Il faut toutefois considérer que les kinases PI3K/Akt n'impliquent pas l'action du calcium et que la déphosphorylation induite par l'activation des récepteurs NMDA, lors de nos recherches, dépendait du calcium.

Il existe bien d'autres kinases et phosphatases possibles, mais une diffère des autres, la p38 MAPK. Cette kinase peut aussi réguler la phosphorylation de GSK3 β , mais sur un autre site que la Ser9, soit la Ser389 (Bradley *et al.*, 2012). Ce site agit de la même façon que la Ser9, c'est-à-dire que lorsqu'elle est phosphorylée, l'activité de la kinase diminue. D'autres expériences pourraient être effectuées sur ce site de phosphorylation afin de voir s'il y a des changements d'activité de la p38 MAPK à la suite de l'activation des récepteurs NMDA. Toutefois, nos recherches se sont plutôt dirigées sur la PKC, une kinase importante dans la régulation de GSK3 β , ainsi que dans l'hyperphosphorylation de Tau. La PKC joue plusieurs rôles dans le système nerveux central comme dans la croissance neuronale, dans la structure des synapses par la régulation de la stabilité des microtubules, dans l'induction de l'apoptose, ainsi que dans les processus d'apprentissage et de la mémoire (Khan *et al.*, 2009; Sun et Alkon, 2010; Sun et Alkon, 2012). La PKC a d'ailleurs été identifiée dans plusieurs maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (Alkon *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2009; de Barry *et al.*, 2010). Une panoplie d'articles scientifiques confirme assez clairement les liens entre la PKC et les récepteurs NMDA, mais aussi avec la protéine Tau et GSK3 β . La PKC aurait la capacité d'accroître l'ouverture des récepteurs NMDA, en plus d'augmenter le nombre de récepteurs à la membrane (Lan *et al.*, 2001). Une

autre étude démontre que l'activation des récepteurs NMDA permet la régulation de PKC dans une culture de neurones du cervelet (Sun et Alkon, 2012). Donc, il ne faut pas exclure la possibilité que la PKC puisse exercer un rétrocontrôle sur les récepteurs NMDA dans la signalisation identifié.

Pour ce qui est de la protéine Tau, la majorité des études s'entendent à dire qu'une déficience de l'activité de PKC mène à une augmentation de l'activité de GSK3 β et favorise un état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Liu *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Alkon *et al.*, 2007; de Barry *et al.*, 2010). La PKC serait donc importante dans la régulation de GSK3 β afin de réduire son activité et d'empêcher la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires causée par une suractivation de GSK3 β . C'est effectivement ce que confirme un laboratoire américain, que l'activation pharmacologique de la PKC mène à une déphosphorylation de la protéine Tau par l'inhibition de GSK3 β (Khan *et al.*, 2009). Les résultats obtenus lors de nos recherches sont cohérents avec toutes ces publications. Nos expériences montrent que la déphosphorylation de la protéine Tau aux sites Ser199-202, induite par l'activation des récepteurs NR1/NR2A, serait due à l'activation de PKC et subséquemment à la diminution de l'activité de GSK3 β .

La PKC est connue, à ce jour, sous forme de douze isoformes différentes chez les mammifères, classés selon trois catégories : les PKC classiques (cPKC), les nouvelles PKC (nPKC) et les PKC atypiques (aPKC) (de l'anglais, « classical, novel and atypical PKC »). Les PKC classiques comprennent les isoformes α , β (I et II) et γ , les nouvelles PKC sont δ , ϵ , ϵ' , η , θ et μ , alors que les atypiques, ξ , λ et ι (Sun et Alkon, 2012). La quantité d'isoformes peut varier selon l'espèce, par exemple l'aplysie, un mollusque qui ressemble à une limace, n'en a que trois. Éventuellement, d'autres expériences pourraient être effectuées afin d'identifier si la signalisation démontrée dans notre étude par l'activation des récepteurs NMDA serait spécifique à certaines isoformes. Selon nos résultats, la déphosphorylation de la protéine Tau observée est dépendante du calcium. Alors, il est possible que les PKC classiques soient impliquées, puisque le calcium est nécessaire pour leur activation, contrairement aux PKC nouvelles et atypiques. Des

études ont d'ailleurs suggéré que les PKC classiques pouvaient se lier aux récepteurs NMDA, particulièrement la PKC γ , et en modifier leur phosphorylation (Suen *et al.*, 1998; Sanchez-Perez et Felipo, 2005). La phosphorylation du récepteur NMDA entraîne des modifications dans sa localisation sur la membrane et peut aussi mener à son internalisation selon les sites phosphorylés. Jones et Leonard ont même démontré que la modulation des récepteurs NR2A, par l'insuline, serait due à l'action de la PKC (Jones et Leonard, 2005). Des chercheurs ont aussi observé une baisse des PKC classiques dans différentes régions du cerveau lors de la maladie d'Alzheimer, où l'on observe une hyperphosphorylation de la protéine Tau (Masliah *et al.*, 1990). Les PKC classiques sont notamment diminuées dans l'hippocampe, la région étudiée dans nos recherches.

5.3 Conclusion et perspectives thérapeutiques

L'excitotoxicité des récepteurs NMDA et les enchevêtrements neurofibrillaires, composés de la protéine Tau agrégée, sont associés à plusieurs affections neurodégénératives. Parmi celles-ci, une démence bien connue est devenue préoccupante pour les chercheurs vu son augmentation dans la population, la maladie d'Alzheimer. Son incidence pourrait tripler d'ici 2050 entraînant ainsi des coûts astronomiques pour la prise en charge des patients soit environ 2 % du PIB mondial (Hebert *et al.*, 2013). Les recherches s'intensifient pour cette problématique afin d'enrayer, ou du moins, ralentir considérablement la progression de la maladie d'Alzheimer. Différentes stratégies thérapeutiques sont aujourd'hui utilisées comme traitement sans toutefois avoir un ralentissement suffisamment important chez la majorité des patients. Au travers de tous ces médicaments, un semblait particulièrement prometteur, la Mémantine. Ce composé pharmacologique est un antagoniste des récepteurs NMDA qui a pour action de bloquer les récepteurs et ainsi tenter de réduire l'excitotoxicité. Malheureusement, les données cliniques indiquent que les bénéfices cognitifs liés à la consommation de ce médicament sont modestes et que son efficacité thérapeutique n'intéresse qu'un nombre limité de patients atteint de la maladie (Lipton, 2006; Kavirajan, 2009; Herrmann *et al.*, 2011). Les résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire ainsi que d'autres études récentes (Liu

et al., 2007; Hardingham et Bading, 2010), démontrent que l'activation préférentielle des récepteurs NR1/NR2A pourrait s'avérer bénéfique pour les neurones.

De plus, de nombreux travaux plaident en faveur du développement de nouveaux traitements thérapeutiques ciblant les kinases GSK3 β et PKC. D'abord, des chercheurs ont obtenu une hyperphosphorylation de Tau lors d'une suractivation de GSK3 β dans des souris transgéniques, qui altère la mémoire et la reconnaissance spatiale (Takashima, 2006). Llorens-Martin et son équipe ont récemment observé que la suractivation de GSK3 β entraîne des modifications délétères au niveau de la morphologie et de la fonctionnalité des neurones, des effets qui apparaissent également dans les neurones de la maladie d'Alzheimer (Llorens-Martin *et al.*, 2013). D'autres ont démontré que la diminution du gène de GSK3 β (de l'anglais « silencing ») ou l'utilisation d'un inhibiteur, comme le lithium, induit une diminution de la phosphorylation de Tau et une réduction des enchevêtrements neurofibrillaires dans les modèles Alzheimer (Perez *et al.*, 2003; Caccamo *et al.*, 2007; Hurtado *et al.*, 2012). Il est d'ailleurs connu que la GSK3 β est suractivée dans les cerveaux Alzheimer (Hooper *et al.*, 2008). Donc, la diminution de l'activité de GSK3 β serait une cible à considérer dans le traitement de cette maladie.

Alors que pour la PKC, des études montrent qu'un dysfonctionnement de cette kinase a été identifié dans la maladie d'Alzheimer et que son inhibition cause des troubles d'apprentissage et de mémoire (Sun et Alkon, 2010). Quant à eux, les activateurs de PKC ont le potentiel d'améliorer la perte de neurones, ainsi que la perte de mémoire associée à la maladie (Khan *et al.*, 2009). Comme montrée dans notre étude, la PKC serait impliquée dans la régulation de GSK3 β . De fait, des chercheurs ont effectivement démontré que l'inhibition de la PKC mène à une suractivation de GSK3 β qui cause une hyperphosphorylation de Tau, et au niveau comportemental, une altération de la mémoire spatiale (Liu *et al.*, 2003). Ainsi, l'activation de PKC pourrait aussi être une cible potentielle dans le traitement des tauopathies.

Bien entendu, il sera pertinent de vérifier la localisation de la protéine Tau ou encore d'en savoir davantage sur la signalisation par exemple, l'isoforme de PKC impliquée et la régulation des récepteurs NMDA. Il faut toutefois mentionner que notre modèle expérimental comporte ses limites. D'abord, les protéines extraites comprennent toutes les régions de l'hippocampe, c'est-à-dire CA1, CA3 et le gyrus denté (Figure 3.2). La distinction chirurgicale de chaque région pourrait être effectuée afin de voir les effets spécifiques des structures de l'hippocampe. Aussi, l'homogénat de protéines comprend autant les neurones, les interneurones que les cellules gliales. Des études futures seraient nécessaires pour observer les types de cellules en culture ou encore les autres régions du cerveau. Finalement, le modèle nous permet de voir les modifications intracellulaires sur des structures du cerveau encore vivantes, ainsi que de conserver la plupart des connexions entre les structures, mais nous nous sommes toutefois éloignés d'un modèle *in vivo*. Il serait donc intéressant d'approfondir nos recherches afin de voir si l'activation des récepteurs NMDA, de type NR1/NR2A, pourrait réduire les enchevêtrements neurofibrillaires, par le fait même améliorer les capacités cognitives, et ce, dans un modèle transgénique présentant des manifestations histopathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

En définitive, les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire montrent que l'activation spécifique des récepteurs NR1/NR2A entraîne une cascade de signalisations, comprenant l'inhibition de GSK3 β par l'activation de la PKC et finalement à une diminution de la phosphorylation de la protéine Tau aux sites Ser199-202. Ceci suggère que l'activation de ces récepteurs pourrait entraîner des effets bénéfiques pour les neurones par la limitation de la phosphorylation de la protéine Tau et s'avérer capable de retarder la neurotoxicité des récepteurs NR2B. Cette cascade de signalisation pourrait mener au développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour certaines maladies neurodégénératives, qui sont caractérisées par l'excitotoxicité des récepteurs NMDA et des enchevêtrements neurofibrillaires de la protéine Tau.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adamec, E., Mercken, M., Beermann, M.L., Didier, M. et Nixon, R.A. (1997). Acute rise in the concentration of free cytoplasmic calcium leads to dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau. *Brain research*, 757(1), 93-101.
- Alkon, D.L., Sun, M.K. et Nelson, T.J. (2007). PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences*, 28(2), 51-60.
- Allyson, J., Dontigny, E., Auberson, Y., Cyr, M. et Massicotte, G. (2010). Blockade of NR2A-containing NMDA receptors induces Tau phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neural plasticity*, 2010, 340168.
- Alonso, A.D., Di Clerico, J., Li, B., Corbo, C.P., Alaniz, M.E., Grundke-Iqbal, I. et Iqbal, K. (2010). Phosphorylation of tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration. *The Journal of biological chemistry*, 285(40), 30851-30860.
- Auberson, Y.P., Allgeier, H., Bischoff, S., Lingenhoehl, K., Moretti, R. et Schmutz, M. (2002). 5-Phosphonomethylquinoxalinediones as competitive NMDA receptor antagonists with a preference for the human 1A/2A, rather than 1A/2B receptor composition. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 12(7), 1099-1102.
- Avila, J., Leon-Espinosa, G., Garcia, E., Garcia-Escudero, V., Hernandez, F. et Defelipe, J. (2012). Tau Phosphorylation by GSK3 in Different Conditions. *International journal of Alzheimer's disease*, 2012, 578373.
- Bartlett, T.E. et Wang, Y.T. (2013). The intersections of NMDAR-dependent synaptic plasticity and cell survival. *Neuropharmacology*, 74, 59-68.
- Bigot, D. et Hunt, S.P. (1990). Effect of excitatory amino acids on microtubule-associated proteins in cultured cortical and spinal neurones. *Neuroscience letters*, 111(3), 275-280.
- Blalock, E.M., Geddes, J.W., Chen, K.C., Porter, N.M., Markesbery, W.R. et Landfield, P.W. (2004). Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2173-2178.
- Boehm, J. (2013). A 'danse macabre': tau and Fyn in STEP with amyloid beta to facilitate induction of synaptic depression and excitotoxicity. *The European journal of neuroscience*, 37(12), 1925-1930.

- Bradley, C.A., Peineau, S., Taghibiglou, C., Nicolas, C.S., Whitcomb, D.J., Bortolotto, Z.A., Kaang, B.K., Cho, K., Wang, Y.T. et Collingridge, G.L. (2012). A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Frontiers in molecular neuroscience*, 5, 13.
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. et Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain research. Brain research reviews*, 33(1), 95-130.
- Bullmann, T., de Silva, R., Holzer, M., Mori, H. et Arendt, T. (2007). Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. *Hippocampus*, 17(2), 98-102.
- Caccamo, A., Oddo, S., Tran, L.X. et LaFerla, F.M. (2007). Lithium reduces tau phosphorylation but not A beta or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles. *The American journal of pathology*, 170(5), 1669-1675.
- Chen, Z., Chen, B., Xu, W.F., Liu, R.F., Yang, J. et Yu, C.X. (2012). Effects of PTEN inhibition on regulation of tau phosphorylation in an okadaic acid-induced neurodegeneration model. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 30(6), 411-419.
- Chohan, M.O. et Iqbal, K. (2006). From tau to toxicity: emerging roles of NMDA receptor in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* 10(1), 81-87.
- Choo, A.M., Geddes-Klein, D.M., Hockenberry, A., Scarsella, D., Mesfin, M.N., Singh, P., Patel, T.P. et Meaney, D.F. (2012). NR2A and NR2B subunits differentially mediate MAP kinase signaling and mitochondrial morphology following excitotoxic insult. *Neurochemistry international*, 60(5), 506-516.
- Couratier, P., Lesort, M., Sindou, P., Esclaire, F., Yardin, C. et Hugon, J. (1996). Modifications of neuronal phosphorylated tau immunoreactivity induced by NMDA toxicity. *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid*, 27(3), 259-273.
- Danysz, W., Parsons, C.G., Bresink, I. et Quack, G. (1995). Glutamate in CNS disorders. *Drug News and Perspectives*, 8, 261-261.
- de Barry, J., Liegeois, C.M. et Janoshazi, A. (2010). Protein kinase C as a peripheral biomarker for Alzheimer's disease. *Experimental gerontology*, 45(1), 64-69.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. et Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*, 22(9), 391-397.

- Erreger, K., Dravid, S.M., Banke, T.G., Wyllie, D.J. et Traynelis, S.F. (2005). Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *The Journal of physiology*, 563(Pt 2), 345-358.
- Farinelli, M., Heitz, F.D., Grewe, B.F., Tyagarajan, S.K., Helmchen, F. et Mansuy, I.M. (2012). Selective regulation of NR2B by protein phosphatase-1 for the control of the NMDA receptor in neuroprotection. *PloS one*, 7(3), e34047.
- Fleming, L.M. et Johnson, G.V. (1995). Modulation of the phosphorylation state of tau in situ: the roles of calcium and cyclic AMP. *The Biochemical journal*, 309 (Pt 1), 41-47.
- Gendron, T.F. et Petrucelli, L. (2009). The role of tau in neurodegeneration. *Molecular neurodegeneration*, 4, 13.
- Gong, C.X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I. et Iqbal, K. (2006). Dysregulation of protein phosphorylation/dephosphorylation in Alzheimer's disease: a therapeutic target. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2006(3), 31825.
- Gould, E., Cameron, H.A. et McEwen, B.S. (1994). Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 340(4), 551-565.
- Guilarte, T.R. et McGlothan, J.L. (2003). Selective decrease in NR1 subunit splice variant mRNA in the hippocampus of Pb²⁺-exposed rats: implications for synaptic targeting and cell surface expression of NMDAR complexes. *Brain research. Molecular brain research*, 113(1-2), 37-43.
- Haass, C. et Mandelkow, E. (2010). Fyn-tau-amyloid: a toxic triad. *Cell*, 142(3), 356-358.
- Hardingham, G.E. et Bading, H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends in neurosciences*, 26(2), 81-89.
- Hardingham, G.E. et Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 11(10), 682-696.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y. et Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature neuroscience*, 5(5), 405-414.
- Hashimoto, R., Hough, C., Nakazawa, T., Yamamoto, T. et Chuang, D.M. (2002). Lithium protection against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons: involvement of NMDA receptor inhibition possibly by decreasing NR2B tyrosine phosphorylation. *Journal of neurochemistry*, 80(4), 589-597.

- Hebert, L.E., Weuve, J., Scherr, P.A. et Evans, D.A. (2013). Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*, 80(19), 1778-1783.
- Hernandez, F., Gomez de Barreda, E., Fuster-Matanzo, A., Lucas, J.J. et Avila, J. (2010). GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Experimental neurology*, 223(2), 322-325.
- Herrmann, N., Li, A. et Lanctot, K. (2011). Memantine in dementia: a review of the current evidence. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 12(5), 787-800.
- Hooper, C., Killick, R. et Lovestone, S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 104(6), 1433-1439.
- Hooper, C., Markevich, V., Plattner, F., Killick, R., Schofield, E., Engel, T., Hernandez, F., Anderton, B., Rosenblum, K., Bliss, T., Cooke, S.F., Avila, J., Lucas, J.J., Giese, K.P., Stephenson, J. et Lovestone, S. (2007). Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *The European journal of neuroscience*, 25(1), 81-86.
- Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., Yuan, L.L., Ashe, K.H. et Liao, D. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*, 68(6), 1067-1081.
- Hurtado, D.E., Molina-Porcel, L., Carroll, J.C., Macdonald, C., Aboagye, A.K., Trojanowski, J.Q. et Lee, V.M. (2012). Selectively silencing GSK-3 isoforms reduces plaques and tangles in mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(21), 7392-7402.
- Hynd, M.R., Scott, H.L. et Dodd, P.R. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 45(5), 583-595.
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vockler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovskaja, V., Turski, L. et Olney, J.W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283(5398), 70-74.
- Isokawa, M. et Levesque, M.F. (1991). Increased NMDA responses and dendritic degeneration in human epileptic hippocampal neurons in slices. *Neuroscience letters*, 132(2), 212-216.

- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wolfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E. et Gotz, J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142(3), 387-397.
- Ivanov, A., Pellegrino, C., Rama, S., Dumalska, I., Salyha, Y., Ben-Ari, Y. et Medina, I. (2006). Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of physiology*, 572(Pt 3), 789-798.
- Jones, M.L. et Leonard, J.P. (2005). PKC site mutations reveal differential modulation by insulin of NMDA receptors containing NR2A or NR2B subunits. *Journal of neurochemistry*, 92(6), 1431-1438.
- Karpova, A., Mikhaylova, M., Bera, S., Bar, J., Reddy, P.P., Behnisch, T., Rankovic, V., Spilker, C., Bethge, P., Sahin, J., Kaushik, R., Zuschratter, W., Kahne, T., Naumann, M., Gundelfinger, E.D. et Kreutz, M.R. (2013). Encoding and transducing the synaptic or extrasynaptic origin of NMDA receptor signals to the nucleus. *Cell*, 152(5), 1119-1133.
- Kavirajan, H. (2009). Memantine: a comprehensive review of safety and efficacy. *Expert opinion on drug safety*, 8(1), 89-109.
- Ke, Y.D., Suchowerska, A.K., van der Hoven, J., De Silva, D.M., Wu, C.W., van Eersel, J., Ittner, A. et Ittner, L.M. (2012). Lessons from tau-deficient mice. *International journal of Alzheimer's disease*, 2012, 873270.
- Khan, T.K., Nelson, T.J., Verma, V.A., Wender, P.A. et Alkon, D.L. (2009). A cellular model of Alzheimer's disease therapeutic efficacy: PKC activation reverses Abeta-induced biomarker abnormality on cultured fibroblasts. *Neurobiology of disease*, 34(2), 332-339.
- Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I. et Iqbal, K. (1994). Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS letters*, 351(1), 80-84.
- Lan, J.Y., Skeberdis, V.A., Jover, T., Grooms, S.Y., Lin, Y., Araneda, R.C., Zheng, X., Bennett, M.V. et Zukin, R.S. (2001). Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nature neuroscience*, 4(4), 382-390.
- Lau, A. et Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 460(2), 525-542.
- Lee, V.M., Brunden, K.R., Hutton, M. et Trojanowski, J.Q. (2011). Developing therapeutic approaches to tau, selected kinases, and related neuronal protein targets. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a006437.

- Leroy, K., Yilmaz, Z. et Brion, J.P. (2007). Increased level of active GSK-3 β in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathology and applied neurobiology*, 33(1), 43-55.
- Li, X., Lu, F., Tian, Q., Yang, Y., Wang, Q. et Wang, J.Z. (2006). Activation of glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation in rat hippocampus slices in culture. *Journal of Neural Transmission*, 113(1), 93-102.
- Lipton, S.A. (2006). Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(2), 160-170.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. et Gong, C.X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *The European journal of neuroscience*, 22(8), 1942-1950.
- Liu, S.J., Zhang, A.H., Li, H.L., Wang, Q., Deng, H.M., Netzer, W.J., Xu, H. et Wang, J.Z. (2003). Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory. *Journal of neurochemistry*, 87(6), 1333-1344.
- Liu, Y., Wong, T.P., Aarts, M., Rooyakkers, A., Liu, L., Lai, T.W., Wu, D.C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M. et Wang, Y.T. (2007). NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(11), 2846-2857.
- Llorens-Martin, M., Fuster-Matanzo, A., Teixeira, C.M., Jurado-Arjona, J., Ulloa, F., Defelipe, J., Rabano, A., Hernandez, F., Soriano, E. et Avila, J. (2013). GSK-3 β overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo. *Molecular psychiatry*, 18(4), 451-460.
- Llorens-Martin, M., Teixeira, C.M., Fuster-Matanzo, A., Jurado-Arjona, J., Borrell, V., Soriano, E., Avila, J. et Hernandez, F. (2012). Tau isoform with three microtubule binding domains is a marker of new axons generated from the subgranular zone in the hippocampal dentate gyrus: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* 29(4), 921-930.
- Lo, E.H., Dalkara, T. et Moskowitz, M.A. (2003). Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(5), 399-415.

- Louis, J.V., Martens, E., Borghgraef, P., Lambrecht, C., Sents, W., Longin, S., Zwaenepoel, K., Pijnenborg, R., Landrieu, I., Lippens, G., Ledermann, B., Gotz, J., Van Leuven, F., Goris, J. et Janssens, V. (2011). Mice lacking phosphatase PP2A subunit PR61/B'delta (Ppp2r5d) develop spatially restricted tauopathy by deregulation of CDK5 and GSK3beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(17), 6957-6962.
- Lucas, J.J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Hen, R. et Avila, J. (2001). Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *The EMBO journal*, 20(1-2), 27-39.
- Luna-Munoz, J., Chavez-Macias, L., Garcia-Sierra, F. et Mena, R. (2007). Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* 12(4), 365-375.
- Mandelkow, E.M. et Mandelkow, E. (1998). Tau in Alzheimer's disease. *Trends in cell biology*, 8(11), 425-427.
- Martel, M.A., Wyllie, D.J. et Hardingham, G.E. (2009). In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience*, 158(1), 334-343.
- Martin, L., Latypova, X. et Terro, F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 58(4), 458-471.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C.M., Magnaudeix, A., Perrin, M.L. et Terro, F. (2013a). Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. *Ageing research reviews*, 12(1), 39-49.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C.M., Magnaudeix, A., Perrin, M.L., Yardin, C. et Terro, F. (2013b). Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*, 12(1), 289-309.
- Masliah, E., Cole, G., Shimohama, S., Hansen, L., DeTeresa, R., Terry, R.D. et Saitoh, T. (1990). Differential involvement of protein kinase C isozymes in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 10(7), 2113-2124.
- Mattson, M.P. (1995). Degenerative and protective signaling mechanisms in the neurofibrillary pathology of AD. *Neurobiology of aging*, 16(3), 447-457; discussion 458-463.

- Maurage, C.A., Sergeant, N., Ruchoux, M.M., Hauw, J.J. et Delacourte, A. (2003). Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology. *Acta neuropathologica*, 105(2), 89-97.
- Meldrum, B.S. (1995). Neurotransmission in epilepsy. *Epilepsia*, 36 Suppl 1, S30-35.
- Michaelis, E.K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in neurobiology*, 54(4), 369-415.
- Monti, B. et Contestabile, A. (2000). Blockade of the NMDA receptor increases developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat cerebellum. *European Journal of Neuroscience*, 12(9), 3117-3123.
- Montoro, R.J., Diaz-Nido, J., Avila, J. et Lopez-Barneo, J. (1993). N-methyl-D-aspartate stimulates the dephosphorylation of the microtubule-associated protein 2 and potentiates excitatory synaptic pathways in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 54(4), 859-871.
- Morimoto, K. (1989). Seizure-triggering mechanisms in the kindling model of epilepsy: collapse of GABA-mediated inhibition and activation of NMDA receptors. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 13(4), 253-260.
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K. et Mucke, L. (2011). The many faces of tau. *Neuron*, 70(3), 410-426.
- Mota, S.I., Ferreira, I.L. et Rego, A.C. (2014). Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease - A focus on NMDA receptors. *Neuropharmacology*, 76 Pt A, 16-26.
- Nihei, M.K., Desmond, N.L., McGlothan, J.L., Kuhlmann, A.C. et Guilarte, T.R. (2000). N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes are associated with lead-induced deficits of long-term potentiation and spatial learning. *Neuroscience*, 99(2), 233-242.
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Veeranna, Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahljianian, M., Lau, L.F. et Duff, K. (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron*, 38(4), 555-565.
- Nykanen, N.P., Kysenius, K., Sakha, P., Tammela, P. et Huttunen, H.J. (2012). gamma-Aminobutyric acid type A (GABAA) receptor activation modulates tau phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 287(9), 6743-6752.

- Papadia, S. et Hardingham, G.E. (2007). The dichotomy of NMDA receptor signaling. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 13(6), 572-579.
- Papadia, S., Soriano, F.X., Leveille, F., Martel, M.A., Dakin, K.A., Hansen, H.H., Kaindl, A., Sifringer, M., Fowler, J., Stefovskaja, V., McKenzie, G., Craigho, M., Corriveau, R., Ghazal, P., Horsburgh, K., Yankner, B.A., Wyllie, D.J., Ikonomidou, C. et Hardingham, G.E. (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nature neuroscience*, 11(4), 476-487.
- Paxinos, G. et Watson, C. (2006). The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition, *Academic press*.
- Perez, M., Hernandez, F., Lim, F., Diaz-Nido, J. et Avila, J. (2003). Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *Journal of Alzheimer's disease* 5(4), 301-308.
- Piedrahita, D., Hernandez, I., Lopez-Tobon, A., Fedorov, D., Obara, B., Manjunath, B.S., Boudreau, R.L., Davidson, B., Laferla, F., Gallego-Gomez, J.C., Kosik, K.S. et Cardona-Gomez, G.P. (2010). Silencing of CDK5 reduces neurofibrillary tangles in transgenic alzheimer's mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(42), 13966-13976.
- Plattner, F., Angelo, M. et Giese, K.P. (2006). The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 281(35), 25457-25465.
- Pooler, A.M., Usardi, A., Evans, C.J., Philpott, K.L., Noble, W. et Hanger, D.P. (2012). Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiology of aging*, 33(2), 431 427-438.
- Quinlan, E.M. et Halpain, S. (1996). Postsynaptic mechanisms for bidirectional control of MAP2 phosphorylation by glutamate receptors. *Neuron*, 16(2), 357-368.
- Rahman, A., Ting, K., Cullen, K.M., Braidy, N., Brew, B.J. et Guillemin, G.J. (2009). The excitotoxin quinolinic acid induces tau phosphorylation in human neurons. *PloS one*, 4(7), e6344.
- Riedel, G., Platt, B. et Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural brain research*, 140(1-2), 1-47.
- Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A. et Arias, C. (2011). GSK3 Function in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011, 189728.

- Sanchez-Perez, A.M. et Felipo, V. (2005). Serines 890 and 896 of the NMDA receptor subunit NR1 are differentially phosphorylated by protein kinase C isoforms. *Neurochemistry international*, 47(1-2), 84-91.
- Sanchez, C., Ulloa, L., Montoro, R.J., Lopez-Barneo, J. et Avila, J. (1997). NMDA-glutamate receptors regulate phosphorylation of dendritic cytoskeletal proteins in the hippocampus. *Brain research*, 765(1), 141-148.
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A. et Roche, K.W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 19(1), 62-75.
- Sereno, L., Coma, M., Rodriguez, M., Sanchez-Ferrer, P., Sanchez, M.B., Gich, I., Agullo, J.M., Perez, M., Avila, J., Guardia-Laguarta, C., Clarimon, J., Lleo, A. et Gomez-Isla, T. (2009). A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiology of disease*, 35(3), 359-367.
- Shahpasand, K., Uemura, I., Saito, T., Asano, T., Hata, K., Shibata, K., Toyoshima, Y., Hasegawa, M. et Hisanaga, S. (2012). Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(7), 2430-2441.
- Shukla, V., Skuntz, S. et Pant, H.C. (2012). Deregulated Cdk5 activity is involved in inducing Alzheimer's disease. *Archives of medical research*, 43(8), 655-662.
- Sindou, P., Lesort, M., Couratier, P., Yardin, C., Esclaire, F. et Hugon, J. (1994). Glutamate increases tau phosphorylation in primary neuronal cultures from fetal rat cerebral cortex. *Brain research*, 646(1), 124-128.
- Sjoberg, M.K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R.B. et Bonnefoy, E. (2006). Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *Journal of cell science*, 119(Pt 10), 2025-2034.
- Spillantini, M.G. et Goedert, M. (1998). Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences*, 21(10), 428-433.
- Suen, P.C., Wu, K., Xu, J.L., Lin, S.Y., Levine, E.S. et Black, I.B. (1998). NMDA receptor subunits in the postsynaptic density of rat brain: expression and phosphorylation by endogenous protein kinases. *Brain research. Molecular brain research*, 59(2), 215-228.
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Begard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., Colin, M., Bonnefoy, E., Buee, L. et Galas, M.C. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *The Journal of biological chemistry*, 286(6), 4566-4575.

- Sun, M.K. et Alkon, D.L. (2010). Pharmacology of protein kinase C activators: cognition-enhancing and antidementic therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, 127(1), 66-77.
- Sun, M.K. et Alkon, D.L. (2012). Activation of protein kinase C isozymes for the treatment of dementias. *Advances in Pharmacology*, 64, 273-302.
- Takashima, A. (2006). GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* 9(3 Suppl), 309-317.
- Takuma, H., Arawaka, S. et Mori, H. (2003). Isoforms changes of tau protein during development in various species. *Brain research. Developmental brain research*, 142(2), 121-127.
- Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C. et Gage, F.H. (2006). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature*, 442(7105), 929-933.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J. et Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, 62(3), 405-496.
- Trepanier, C.H., Jackson, M.F. et MacDonald, J.F. (2012). Regulation of NMDA receptors by the tyrosine kinase Fyn. *The FEBS journal*, 279(1), 12-19.
- Utton, M.A., Vandecandelaere, A., Wagner, U., Reynolds, C.H., Gibb, G.M., Miller, C.C., Bayley, P.M. et Anderton, B.H. (1997). Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase 3beta affects the ability of tau to promote microtubule self-assembly. *The Biochemical journal*, 323 (Pt 3), 741-747.
- Voss, K. et Gamblin, T.C. (2009). GSK-3beta phosphorylation of functionally distinct tau isoforms has differential, but mild effects. *Molecular neurodegeneration*, 4, 18.
- Wang, C.C., Held, R.G., Chang, S.C., Yang, L., Delpire, E., Ghosh, A. et Hall, B.J. (2011). A critical role for GluN2B-containing NMDA receptors in cortical development and function. *Neuron*, 72(5), 789-805.
- Wang, J.Z. et Liu, F. (2008). Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Progress in neurobiology*, 85(2), 148-175.
- Wang, J.Z., Xia, Y.Y., Grundke-Iqbal, I. et Iqbal, K. (2013). Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *Journal of Alzheimer's disease* 33 Suppl 1, S123-139.

- Waxman, E.A. et Lynch, D.R. (2005). N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 11(1), 37-49.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y. et Kirschner, M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), 1858-1862.
- Wen, Y., Planel, E., Herman, M., Figueroa, H.Y., Wang, L., Liu, L., Lau, L.F., Yu, W.H. et Duff, K.E. (2008). Interplay between cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 beta mediated by neuregulin signaling leads to differential effects on tau phosphorylation and amyloid precursor protein processing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(10), 2624-2632.
- Yashiro, K. et Philpot, B.D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, 55(7), 1081-1094.
- Yu, J.T., Chang, R.C. et Tan, L. (2009). Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Progress in neurobiology*, 89(3), 240-255.
- Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E. et Mandelkow, E.M. (2010). Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(36), 11938-11950.